



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIA E NANOBIOTECNOLOGIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**DESENVOLVIMENTO DE NANOCOMPÓSITOS DE OURO/PLURONIC  
PARA APLICAÇÕES BIOLÓGICAS**

ALINE BEATRIZ DA SILVA SANTOS

Brasília - DF  
Agosto/2023

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**DESENVOLVIMENTO DE NANOCOMPÓSITOS DE OURO/PLURONIC  
PARA APLICAÇÕES BIOLÓGICAS**

ALINE BEATRIZ DA SILVA SANTOS

ORIENTADORA:

Professora MARIA APARECIDA GODOY SOLER

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia da Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Nanociência e Nanobiotecnologia.

Brasília - DF  
Agosto/2023

*Ao Espírito Santo de Deus,  
 à minha mãe Clarinda (Klari), à  
 minha sobrinha-filha Alice, aos meus  
 amigos e demais pessoas que me ajudaram  
 a chegar até aqui.*

# Agradecimentos

Agradeço a Deus pela renovação de forças diária, por me dar várias segundas chances ao longo dessa caminhada, pelas inúmeras bênçãos, livramentos e pelo seu grande amor por mim e pela minha família.

À minha incrível mãe Clara e a minha sobrinha-filha Alice, que me dão forças e me relembram sempre das coisas mais importantes da vida.

À minha orientadora Professora Dra. Maria Aparecida Godoy Soler, por confiar em mim, acreditar no meu potencial, ser paciente, me dar oportunidade de conhecer e trabalhar com nanociência e me auxiliar desde a graduação nessa jornada científica.

À Deizinha (Deizilene Souza), que me apresentou às práticas laboratoriais de nanopartículas, por todo ensinamento de síntese, equipamentos, cálculos e pesquisa teórica, além de continuar me ajudando mesmo de longe. Sem a sua ajuda, o trabalho teria sido muito mais complicado.

A meus companheiros de laboratório Débora, Deyse, Luana, Camila, Antonia, Luís, Rafael, Juliana, Beatriz, que me ajudam dentro e fora do ambiente de trabalho, mesmo depois de já terem terminado suas pesquisas, transformando o dia-a-dia no laboratório em uma experiência muito melhor, com conversas, almoços, lanches, aniversários, ensinamentos sobre gráficos, imagens, contagem de partículas e técnicas para manusear aparelhos.

Aos meus amigos Natanael, Jacqueline, Milena, Nega, Bella, Belbel, Lucas, Guilherme, Lidi, Pedro Melo, Bruno Iles, Thalita Fonseca, Carla da Laura, Morganninha, Pastor Ricardo Espindola, Pastor Rodrigo Lira, Talita Lira, Fabiana, Isolda, Samuel, Vitória e Danielle.

Aos professores do Núcleo de Física Aplicada Professor Dr. Jorlândio Felix, Professor Dr. Antonio Coaquira, Dr. Sebastião Silva, e aos alunos Alexandre Santos, Emanuel José, João Paulo, Lucas Alves, Jhon Marroquin, Bill Darwin, Carlos Adolfo, Aziz Abrão, pela consideração, amizade, por sempre estarem disponíveis, pelo apoio no laboratório no fornecimento de água e

pelas medidas de UV-Vis, FTIR e Ramam.

Aos Professores do Instituto de Ciências Biológicas Dr. Ricardo Bentes de Azevedo, Dr. Luís Alexandre, Dr. João Paulo Longo, Dra. Maria de Fátima Menezes, Dra. Mônica Pereira, Dra. Sônia Bao, Professora Dra. Glécia Virgolino e Dra. Marcella Carneiro por terem me ensinado tanto, mesmo cursando suas disciplinas no período remoto. À técnica Ingrid Silva pela amizade, apoio e pelas medidas de MET. Aos técnicos Diogo Magnabosco e Karen Rapp pelo apoio no acesso ao laboratório e utilização dos equipamentos. À Professora Dra. Laíse Andrade, pelo direcionamento nos experimentos, e aos seus alunos Ronald Torres e Danielly Stéfany, pela amizade e persistência para alcançar bons resultados nos experimentos fotoquímicos.

Aos Professores do Instituto de Geologia Dr. Jeremie Garnier, Dr. Uidemar Morais e ao técnico Myller de Sousa, pela disponibilização do padrão de ouro para o experimento de absorção atômica e pelo fornecimento de água.

Aos Químicos da Central Analítica do Instituto de Química Dra. Lenine Rodrigues, Dr. Cleber Filomeno e MSc. Alan Mól, pelas medidas de absorção atômica.

À CAPES pelo fornecimento da bolsa que proporcionou a realização deste trabalho.

À Universidade de Brasília, seu ambiente e professores, que despertaram em mim a paixão pela ciência, por ter sido muitas vezes, minha casa, e por ter contribuído durante todos esses anos desde a graduação, para me tornar uma profissional melhor.

“Tem ciúmes de mim, o Seu amor é como um furacão, e eu me rendo ao vento de Sua misericórdia. Então, de repente não vejo mais minhas aflições, eu só vejo a glória. Percebo quão maravilhoso Ele é, e o tanto que Ele me quer. Oh, Ele me amou. Oh, Ele me ama.” *Diante do Trono – Me Ama (John McMillan - How We Loves)*

“I put my armor on show you how strong I am. I put my armor on I'll show you that I am. I'm unstoppable, I'm a Porsche with no brakes. I'm invincible, I win every single game. I'm so powerful, I don't need batteries to play, I'm so confident, I'm unstoppable today” *Sia – Unstoppable*

“Vou lhe fazer uma visita, mas não fique assim aflita que eu não sou de reparar. Não precisa de banquete, nem preocupe com enfeite, não vá empetecar... e dizer-lhe ao pé do ouvido, com um tom meio atrevido dois pra lá e dois pra cá.” *Silva – A visita*

“Tu és o único motivo que me fez chegar. Só Tu és santo, não há outro como Tu, não há outro como Jesus... A tempestade é Você, chuva forte é Você, vento forte é Você! A porta aberta é Você, mas a fechada é Você! É tudo sobre Você.” *Morada – Só Tu És Santo/É Tudo Sobre Você*

“Yo no soy y ni voy a ser tu bizcochito, pero tengo to' lo que tiene delito. Que me pongan en el sol, que me derrito, el mal de ojo que me manden me lo quito ta-ra-rá, ta-ra-rá, ta-tá. ¿Tú ere' el que pimpea o te pimpean a ti? Yo elegí mi la'o desde el día en que nací.” *Rosalía – BIZCOCHITO*

“Una loba como yo no está pa' tipos como tú-uh-uh-uh-uh. Pa' tipos como tú-uh-uh-uh-uh a ti te quedé grande... oh-oh, oh-oh.” *Shakira - Bzrp Music Sessions, vol. 53*

“Antes de eu falar tu cantavas sobre mim. Antes de eu respirar sopraste tua vida em mim. Inimigo eu fui mas seu amor lutou por mim. Não tinha valor, mas tudo pagou por mim. Tu tens sido tão tão bom pra mim.” *Isaías Saad – Ousado Amor*

“Quem sou eu pra que o grande rei me receba assim? Me perdi e ele me encontrou, seu amor por mim. Quem Deus libertar, livre enfim será. Sou filho de Deus, sim eu sou. Em tua casa, oh, pai, há um lugar pra mim. Escolhido, perdoado. Eu sou quem dizes que eu sou, Tu és por mim até o fim.” *Hillsong Worship – Quem Dizes Que Eu Sou.*

“I've been reading books of old, the legends and the myths, the testaments they told and clearly I don't see myself upon that list. Where'd you wanna go? How much you wanna risk? I'm not lookin' for somebody with some superhuman gifts... Just something I can turn to, somebody I can kiss. I want something just like this.” *Coldplay e The Chainsmokers - Something Just Like This*

“I've got another confession, my friend I'm no fool, everyone's got their chains to break holdin' you. Were you born to resist or be abused? Is someone getting the best, the best, the best, the best of you?” *Foo Fighters – Best of You*

“Digno desta canção, só tu és, Senhor. Digno do meu louvor, tu és, Senhor. Digno da minha vida tu és, Senhor. Nome que é sobre todos é o teu, Jesus. Fonte da salvação, só tu és, Jesus. Digno da minha vida tu és Jesus. Santo, és incomparável, és inigualável, abre os meus olhos, Senhor. Mostra quem Tu és e enche o meu coração do amor que faz mudar o mundo. Eu vou construir minha vida em Ti, Tu és meu fundamento. Eu vou confiar somente em Ti, não vou ser abalado.” *Livres para Adorar – Eu vou construir*

“So don't stop me now 'cause I'm having a good time having a good time. I'm a shooting star leaping through the sky, like a tiger defying the laws of gravity. I'm a racing car passing by like Lady Godiva I'm gonna go go go there's no stopping me. I'm burnin' through the sky, yeah! 200 degrees, that's why they call me Mister Fahrenheit” *Queen – Don't Stop Me Now*

“When I'm away from you, I'm happier than ever, wish I could explain it better, I wish it wasn't true. I don't relate to you, I don't relate to you, no. 'Cause I'd never treat me this shitty, you made me hate this experience... So don't waste the time I don't have, and don't try to make me feel bad. You ruined everything good... Just fucking leave me alone. *Billie Eilish - Happier Than Ever*

“Quando estiver frente ao mar e não puder atravessar, chame este homem com fé, só Ele abre o mar. Não tenha medo irmão se atrás vem faraó, Deus vai te atravessar e você vai entoar o hino da vitória... É nas horas mais difíceis que Ele mais te vê... Se passares pelo fogo, não vai te queimar, se nas águas tu passares, não vão te afogar.” *Cassiane – Hino da Vitória*

# Resumo

O objetivo deste trabalho é a preparação, caracterização e aplicação biomédica de nanocompósitos coloidais formados por nanopartículas de ouro (AuNPs) e Pluronic® F-127. Os nanocompósitos foram sintetizados a partir da mistura das soluções do copolímero tribloco Pluronic® F-127 (PLU) variando-se as concentrações em (0,5 e 2,0 mmol.L<sup>-1</sup>), e do ácido cloroáurico (HAuCl<sub>4</sub>) (2,0; 3,0 e 4,0 mmol.L<sup>-1</sup>), em uma câmara de radiação UV (254 nm), à temperatura ambiente. Nesta reação o copolímero atua na redução dos íons de ouro e estabilização das nanopartículas, formando o nanocompósito AuNP-PLU. A análise por espectroscopia do ultravioleta-visível (UV-Vis) mostra que a banda de ressonância plasmônica de superfície dos nanocompósitos está localizada entre 525 a 529 nm. As micrografias dos nanocompósitos obtidas por microscopia eletrônica de transmissão, mostraram AuNPs com formato esférico, triangular e cilíndrico, com diâmetro médio de 5 a 44 nm. O tamanho hidrodinâmico (D<sub>H</sub>) médio obtido por espalhamento dinâmico de luz variou de 29,4 a 50,5 nm. Os espectros de infravermelho e Raman revelaram a presença de íons de ouro na cadeia polimérica e dos produtos de oxidação do copolímero. Para os experimentos de aplicação biológica, foram selecionados os nanocompósitos 2.0AuNP-PLU:2.0 e o 2.0AuNP-PLU:0.5, por apresentarem maior reprodutibilidade e estabilidade das características físico-químicas. Os nanocompósitos foram empregados no teste fotoquímico com 1,3-difenilisobenzofurano, no qual foi observada a formação de espécies reativas de oxigênio comumente empregadas na Terapia Fotodinâmica. Para realização deste teste, as nanopartículas foram associadas ao fotossensibilizador Cloreto de Ftalocianina de Alumínio (AlClPc), nas concentrações de 0,1 a 5,0 µg. Após a mistura com o fotossensibilizador, os nanocompósitos foram caracterizados por espectroscopia no UV-Vis, na qual foi possível observar um novo pico em 680 nm advindo da banda Q do AlClPc. O novo D<sub>H</sub> médio dos nanocompósitos associados ao fotossensibilizador foi de 29,4 a 30,8 nm. A caracterização por espectroscopia no infravermelho e Raman mostraram alterações nos espectros que podem ser atribuídas às ligações entre os grupos éter do PLU com os grupos nitrogenados do AlClPc. Em outra abordagem, o nanocompósito 2.0AuNP-PLU:2.0, que apresentou viabilidade celular em teste *in vitro*, foi empregado em testes *in vivo* para estudo dos efeitos toxicológicos materno-fetais durante a prenhez de ratas. Os resultados demonstraram que o nanocompósito é seguro tanto para a mãe quanto para o feto, na dose de 137,5 µg/kg. Não resultando em alterações no desenvolvimento fetal, nem alterações significativas maiores do que 5% nos órgãos e parâmetros investigados durante a prenhez. Além disso, o nanocompósito 2.0AuNP-PLU:2.0 foi estudado como agente de contraste em tomografia computadorizada de raios-X. Os resultados foram comparáveis ao contraste hospitalar utilizado comercialmente Optiray® 320 para a mesma energia de feixe.

**Palavras-chave:** nanopartícula de ouro, Pluronic® F-127, nanocompósitos coloidais, banda de ressonância plasmônica de superfície localizada, cloreto de ftalocianina de alumínio, espécies reativas de oxigênio, terapia fotodinâmica, tomografia computadorizada, teste *in vivo* em ratas prenhas, avaliação da toxicidade materno-fetal.

# Abstract

The objective of this work is the preparation, characterization and biomedical application of colloidal nanocomposites formed by gold nanoparticles (AuNPs) and Pluronic® F-127. The nanocomposites were synthesized from the mixture of solutions of the triblock copolymer Pluronic® F-127 (PLU), varying the concentrations (0.5 and 2.0 mmol.L<sup>-1</sup>), and chloroauric acid (HAuCl<sub>4</sub>) (2.0, 3.0 and 4.0 mmol.L<sup>-1</sup>), in a UV radiation chamber (254 nm), at room temperature. In this reaction, the copolymer acts to reduce gold ions and stabilize the nanoparticles, forming the AuNP-PLU nanocomposite. Ultraviolet-visible (UV-Vis) spectroscopy analysis shows that the surface plasmon resonance band of the nanocomposites is located between 525 and 529 nm. Micrographs of the nanocomposites obtained by transmission electron microscopy showed AuNPs with spherical, triangular and cylindrical shapes, with an average diameter of 5 to 44 nm. The average hydrodynamic size ( $D_H$ ) obtained by dynamic light scattering ranged from 29.4 to 50.5 nm. Infrared and Raman spectra revealed the presence of gold ions in the polymer chain and oxidation products of the copolymer. For the biological application experiments, the 2.0AuNP-PLU:2.0 and 2.0AuNP-PLU:0.5 nanocomposites were selected, as they present greater reproducibility and stability of the physicochemical characteristics. The nanocomposites were used in the photochemical test with 1,3-diphenylisobenzofuran, in which the formation of reactive oxygen species commonly used in Photodynamic Therapy was observed. To carry out this test, the nanoparticles were associated with the photosensitizer Aluminum Phthalocyanine Chloride (AlClPc), at concentrations of 0.1 to 5.0 µg. After mixing with the photosensitizer, the nanocomposites were characterized by UV-Vis spectroscopy, in which it was possible to observe a new peak at 680 nm arising from the Q band of AlClPc. The new  $D_H$  of the nanocomposites associated with the photosensitizer was 29.4 to 30.8 nm. Characterization by infrared spectroscopy and Raman showed changes in the spectra that can be attributed to the bonds between the ether groups of PLU and the nitrogenous groups of AlClPc. In another approach, the 2.0AuNP-PLU:2.0 nanocomposite, which showed cell viability in an in vitro test, was used in in vivo tests to study maternal-fetal toxicological effects during pregnancy in rats. The results demonstrated that the nanocomposite is safe for both the mother and the fetus, at a dose of 137.5 µg/kg. It does not result in changes in fetal development, nor significant changes greater than 5% in the organs and parameters investigated during pregnancy. Furthermore, the 2.0AuNP-PLU:2.0 nanocomposite was studied as a contrast agent in X-ray computed tomography. The results were comparable to the commercially used hospital contrast Optiray® 320 for the same beam energy.

**Keywords:** gold nanoparticle, Pluronic® F-127, colloidal nanocomposites, localized surface plasmon resonance band, aluminum phthalocyanine chloride, reactive oxygen species, photodynamic therapy, computed tomography, in vivo test in pregnant rats, evaluation maternal-fetal toxicity.



# Sumário

Capítulo 1 – Introdução.....	15
1.1 Motivação .....	19
1.2 Justificativa.....	20
1.3 Objetivos.....	20
 Capítulo 2 - Revisão Bibliográfica.....	 22
 Capítulo 3 - Materiais e Métodos.....	 31
3.1 Materiais Empregados na Síntese dos Nanocompósitos AuNP-PLU.....	31
3.2 Síntese dos Nanocompósitos AuNP-PLU.....	31
3.3 Preparação do sistema AuNP-PLU-AICIPc.....	33
3.4 Aplicações biológicas.....	33
3.5 Técnicas de caracterização.....	38
 Capítulo 4 - Resultados e Discussão.....	 41
4.1 Caracterização dos nanocompósitos.....	41
4.2 Caracterização do sistema AuNP-PLU-AICIPc.....	50
 Capítulo 5 – Aplicações Biológicas.....	 56
5.1 Aplicação biológica do nanocompósito em teste <i>in vivo</i> .....	56
5.2 Aplicação do nanocompósito em Tomografia Computadorizada de Raios-X.....	63
5.3 Aplicação biológica dos nanocompósitos associados a AICIPc.....	65
 Capítulo 6 – Conclusão.....	 68
6.1 Perspectivas.....	70
 Referências Bibliográficas.....	 71
 Anexo: Artigo publicado.....	 78

## Lista de Tabelas

Tabela 1 – Nomenclatura dos nanocompósitos sintetizados e as concentrações de PLU e H <sub>2</sub> AuCl <sub>4</sub> utilizadas.....	32
Tabela 2 – Nomenclatura dos nanocompósitos associados ao fotossensibilizador aplicados no teste fotoquímico e as concentrações de AICIPc empregadas.....	33
Tabela 3 – Dados do diâmetro médio e dispersão obtidos para os nanocompósitos na MET.....	44
Tabela 4 – Diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e potencial zeta dos nanocompósitos.....	46
Tabela 5 – Identificação das principais bandas no infravermelho da solução PLU.....	47
Tabela 6 – Diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e potencial zeta dos nanocompósitos associados ao AICIPc.....	52
Tabela 7 – Dados de peso corporal, ingestão de água e de alimentos no grupo controle e tratado.....	57
Tabela 8 – Dados de massa dos órgãos coração, fígado, baço, rim e os parâmetros bioquímicos do soro no grupo controle e tratado.....	58
Tabela 9 – Dados da prenhez no grupo controle e tratado, implantação e morte fetal.....	59

# Lista de Figuras

Figura 1 - Ilustração de algumas propriedades de físico-químicas, de superfície e funcionalidades de NPs. Adaptada de Gong, N. et al [67].....	16
Figura 2 – MET de AuNPs em diferentes formatos. Adaptado de Nikolai, K. et al [22].....	16
Figura 3 - Ilustração de algumas aplicações que são possíveis devido à versatilidade de tamanho, formato e superfície das AuNPs. Adaptada de Priyanka, S. et al. [64].....	17
Figura 4 - Ilustração em (a) do efeito de agregação e de frequência de ressonância. Adaptada de Louis, C. et al. [69]. Em (b) ilustração do efeito de ressonância plasmônica das AuNPs. Adaptada de Li, Y. et al. [68]. Ilustração das micrografias e AuNPS da autora.....	23
Figura 5 – Fórmula estrutural Pluronic® F-127. Ilustração da autora.....	24
Figura 6 - Ilustrações da formação de AuNPs. Em (a) formação das AuNP-PLU na estrutura núcleo-casca. Em (b) ilustração da estrutura “coroa de éter”. Adaptado de (a) Sakai, T. et al. [27], em (b) Kotlyar, S. A. et al. [70] e Lin, W. et al. [71].....	25
Figura 7 - Ilustração da ação de NPs no tratamento por TFD. Adaptado de Sani, A. et al. [29].....	26
Figura 8 - Ilustração de algumas aplicações medicinais das AuNPs. Adaptado de Priyanka, S. et al. [64].....	27
Figura 9 – Estrutura química do Cloreto de Ftalocianina de Alumínio – AICIPc ( $C_{32}H_{16}AlClN_8$ ). Adaptada de K.R. Py-Daniel, et al [13].....	27
Figura 10 – Ilustração do modelo de micelas de PLU-AICIPc, em (a) abaixo da CMC, em (b) acima da CMC. Adaptada de K.R. Py-Daniel, et al [13].....	28
Figura 11 – Ilustração da visualização dos órgãos e tecidos em uma TC de abdome total antes da aplicação do contraste iodado e 1:55 minutos depois da aplicação. Adaptado de Mergen, V. M. D. et al. [72].....	30
Figura 12 – Ilustração da síntese dos nanocompósitos 4.0AuNP-PLU2.0; 3.0AuNP-PLU2.0; 2.0AuNP-PLU0.5; 2.0AuNP-PLU2.0. Adaptado de Gomes, D. S. B. [55].....	32
Figura 13 - Ilustração dos procedimentos conduzidos com as ratas. Reproduzida de Damasceno, D. C. et al. [65].....	35
Figura 14 - Ilustração da análise das anomalias dos fetos. Reproduzida de Damasceno, D. C. et al. [65].....	36
Figura 15 – Montagem do equipamento para o experimento fotoquímico, em (a) placa sem iluminação, (b) placa sendo irradiação. Imagens cedidas por Torres, R.....	37

Figura 16 – Espectro no UV-Vis do H <sub>2</sub> AuCl <sub>4</sub> e do PLU.....	42
Figura 17 – Espectros UV-Vis dos nanocompósitos 4.0AuNP-PLU2.0; 3.0AuNP-PLU2.0; 2.0AuNP-PLU0.5; 2.0AuNP-PLU2.0, conforme indicação.....	43
Figura 18 - Foto dos nanocompósitos obtidos da esquerda para direita 4.0AuNP-PLU2.0; 3.0AuNP-PLU2.0; 2.0AuNP-PLU2.0; 2.0AuNP-PLU0.5.....	43
Figura 19 – Imagem de MET dos NCs (b)-AuNP-PLU:2,0UV, (d)-AuNP-PLU:0,5UV, (f)-3,0UV:AuNP-PLU, (h)-4,0UV:AuNP-PLU e (j)-AuNP-PLU:1,0UV.....	45
Figura 20 - Espectro no infravermelho do PLU.....	47
Figura 21 – Espectro no infravermelho nanocompósito 2.0AuNP-PLU:2.0 e do PLU.....	48
Figura 22 – Espectro Raman do nanocompósito 2.0AuNP-PLU:2.0 e PLU.....	49
Figura 23 – Espectroscopia UV-Vis do AICIPc.....	50
Figura 24 – Espectroscopia no UV-Vis das amostras associadas ao AICIPc.....	51
Figura 25 – Espectro no infravermelho do AICIPc.....	52
Figura 26 – Espectro no infravermelho do nanocompósito associado ao AICIPc 2.0AuNP-PLU:2.0-5,0µg AICIPc, do 2.0AuNP-PLU:2.0 controle e do AICIPc.....	53
Figura 27 – Espectro Raman do AICIPc.....	54
Figura 28 – Espectro Raman do nanocompósito associado ao AICIPc.....	55
Figura 29 – Gráfico porcentagem de perda pré e pós implantação nos grupos tratado e controle.....	60
Figura 30 – Gráficos de comparação entre grupo tratado e controle, peso fetal e da placenta, ossificação e porcentagem de anomalias.....	61
Figura 31 – Comparação entre os contrastes Optiray@320_1 e 2.0AuNP-PLU:2.0 nas mesmas concentrações.....	64
Figura 32 – Foto dos nanocompósitos associados a AICIPc e seus controles no teste fotoquímico.....	66
Figura 33 - Avaliação do teste de produção de EROs das amostras associadas ao fotossensibilizador, sob irradiação de LED (660 nm).....	67

# Lista de Abreviaturas e Siglas

NPs: nanopartículas

NCs: nanocompósitos coloidais

AuNPs: nanopartículas de ouro

AuNP-PLU: sistema formado por nanopartículas de ouro e o copolímero F127

AuNP-PLU-AIClPc: sistema formado por nanopartículas de ouro, copolímero pluronic e cloreto de ftalocianina de alumínio

PLU: copolímero tribloco Pluronic® F-127

HAuCl<sub>4</sub>: ácido cloroáurico

AIClPc: Cloreto de Ftalocianina de Alumínio

EDL: espalhamento dinâmico de luz

MET: microscopia eletrônica de transmissão

UV ou UV-Vis: região do ultravioleta e visível do espectro eletromagnético

FTIR-ATR: espectroscopia na região do infravermelho

EDL: espalhamento dinâmico de luz

TC: tomografia computadorizada (computed tomography – CT)

PEO: poli(óxido de etileno)

PPO: poli(óxido de propileno)

CMC: concentração micelar crítica

LSPR: banda de ressonância plasmônica de superfície

LMCT: transferência de carga de ligante para metal (ligand to metal charge transfer transition)

EROS: espécies reativas de oxigênio (reactive oxygen species – ROS)

DPBF: 1,3-difenilisobenzofurano

TFD: terapia fotodinâmica (photodynamic therapy – PDT)

DDS: sistema de liberação de fármaco (Drug Delivery System)

D<sub>H</sub>: diâmetro hidrodinâmico médio

$D_m$ : diâmetro médio

PdI: índice de polidispersão

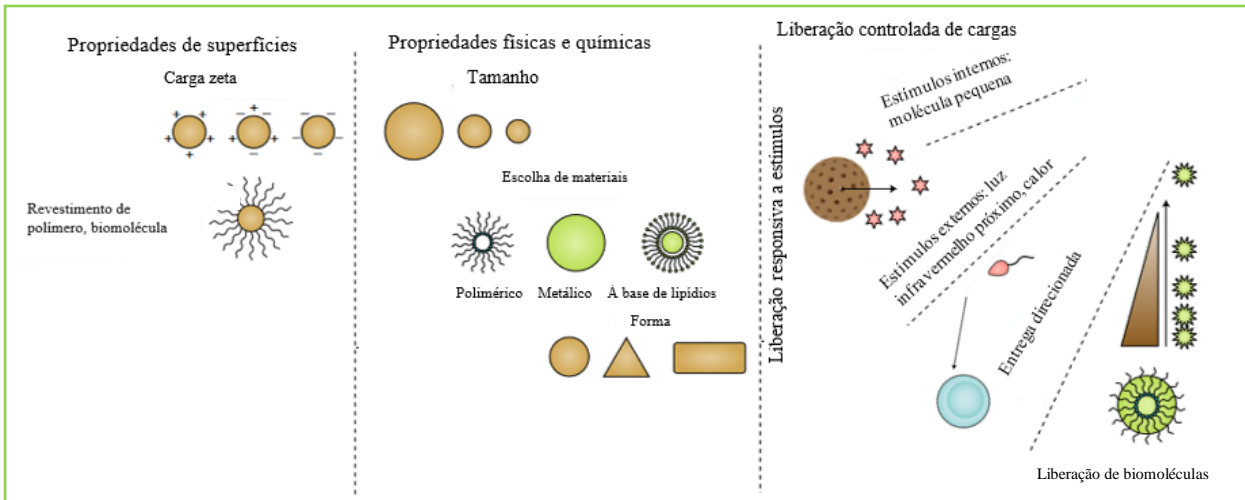
$\zeta$  : potencial zeta

$\sigma$ : desvio padrão do diâmetro

# Capítulo 1

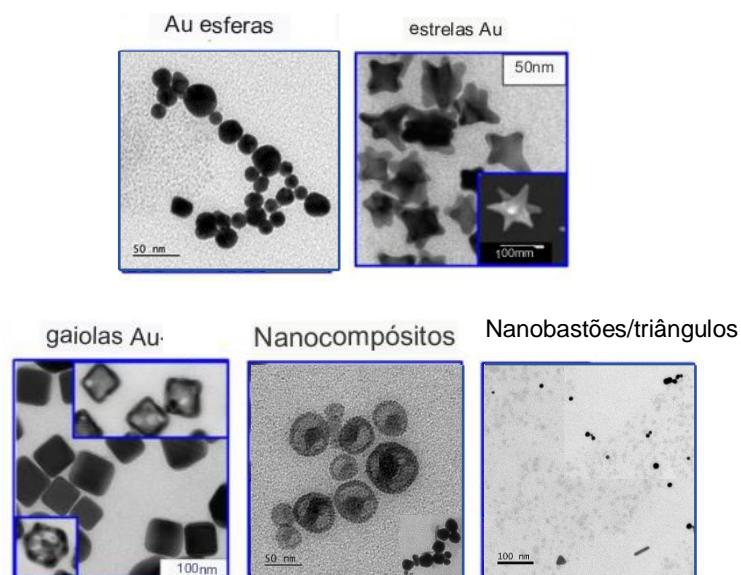
## Introdução

Os estudos envolvendo nanomateriais estão presentes na história da humanidade há muito tempo. Os nanomateriais são estruturas que possuem pelo menos uma de suas dimensões menor do que 100 nanômetros, podem apresentar diversos formatos e diferentes composições e aspectos de superfície, dependendo da sua rota de síntese [4]. Uma das primeiras vezes na qual a presença de materiais em escala nanométrica foi notada, em 1949, quando o físico Louis Néel, apresentava seus resultados sobre o estudo da Teoria da relaxação, na qual ele monitorava o tempo de relaxação em função do volume para certos materiais magnéticos, expressando o resultado em ângström [1]. Mais tarde, em 1959, o físico Richard Feynman, afirmou em sua palestra “There is plenty of room at the bottom – an invitation for a new Field of Physics”, que seria possível a manipulação e o controle de materiais em escala atômica [2]. Mas foi apenas em 1974, que o termo “nanotechnology” surgiu, quando o professor Norio Taniguchi, descreveu deposições de filmes ultrafinos e processos em materiais semicondutores [3]. No Brasil, o termo “Nano” surgiu aproximadamente em 1993, durante a condução de estudos sobre as propriedades de superfície de sólidos, e sobre os efeitos de tamanho nas nanopartículas e em materiais nanoestruturados, desenvolvido por Viatcheslav Zubov [75]. Entre 1974 e 1975, outros estudos contribuíram para o desenvolvimento da nanotecnologia, entre eles os que avaliavam o comportamento anisotrópico de partículas superparamagnéticas por ressonância magnética [73] e os que estudavam a ressonância de raios gama via Mössbauer na decomposição térmica do sulfato de Fe (II) [74]. A nanotecnologia visa manipular as características da estrutura molecular ou atômica de matérias para alcançar as especificações necessárias para aplicações no desenvolvimento de novos dispositivos que podem ser usados em áreas como engenharia, medicina, química, agroindústria, dentre outros [5]. A Figura 1 ilustra algumas propriedades físico-químicas, de superfície e funcionalidades de NPs.



**Figura 1** – Ilustração de algumas propriedades de físico-químicas, de superfície e funcionalidades de NPs. Adaptada de Gong, N. et al [67].

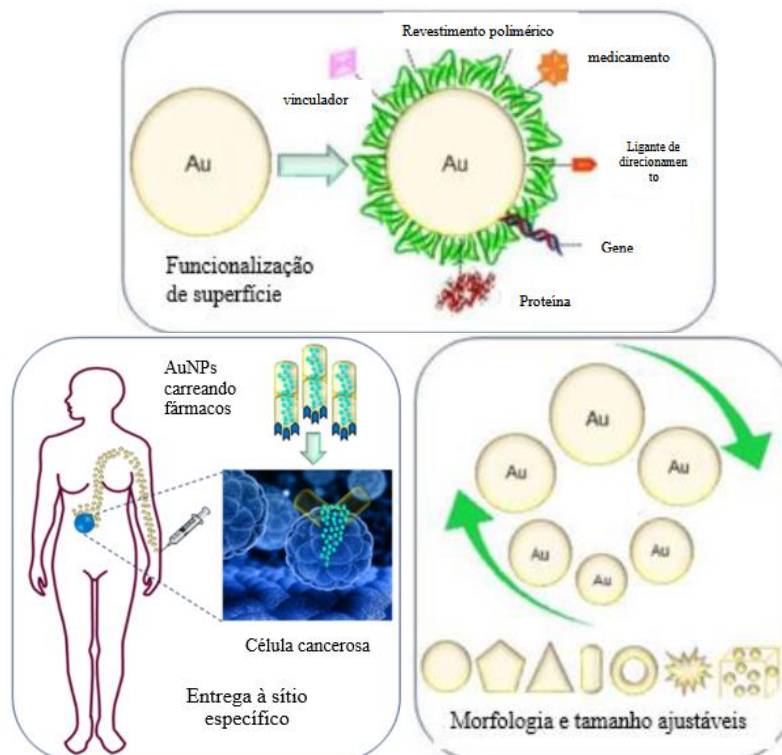
Considerando-se os nanomateriais com formato de nanopartículas, os inorgânicos, em especial, as nanopartículas de ouro (AuNPs) vêm sendo usadas com maior frequência a cada década [6]. AuNPs exibem propriedades físico-químicas únicas, principalmente relacionadas ao fenômeno de ressonância plasmônica de superfície localizada (LSPR) [7]. Para muitas aplicações elas são empregadas em suspensões coloidais, apresentam biocompatibilidade e estabilidade em condições fisiológicas e em ensaios *in vivo* [8]. A Figura 2 mostra os diversos tipos de formatos de AuNPs capturadas por meio da técnica microscopia eletrônica de transmissão (MET).



**Figura 2** – MET de AuNPs em diferentes formatos. Adaptada de Nikolai, K. et al [22].



Os coloides contendo as AuNP vêm sendo empregados como sistemas de liberação de fármacos (DDS - Drug Delivery System), por apresentarem características adequadas como capacidade de transporte a alvos específicos, melhora da eficiência terapêutica, lenta liberação de fármacos, e prevenção de efeitos colaterais adversos [9]. As AuNPs também podem atuar de forma conjunta otimizando o efeitos dos fármacos que já são utilizados em tratamentos antitumorais ou em doenças negligenciadas [10], que não alcançam a eficácia desejada, por causa do seu baixo direcionamento, resistência do organismo, falta de adequação para faixa etária dos pacientes ou por interação inadequada com os receptores celulares, gerando efeitos colaterais indesejados [11]. Em adição, as AuNPs podem sofrer modificações em sua superfície, que permitam a geração de uma carga adequada para interação com o meio celular, conjugadas com moléculas como DNA/RNA ou proteínas específicas, visando melhorar a interação com os receptores na superfície celular, aumentando a eficácia do tratamento [12, 63]. A Figura 3 ilustra algumas aplicações que são possíveis devido à versatilidade de tamanho, formato e superfície das AuNPs.



**Figura 3** – Ilustração de algumas aplicações que são possíveis devido a versatilidade de tamanho, formato e superfície das AuNPs. Adaptada de Priyanka, S. et al. [64].

Em outra abordagem, as AuNPs podem ser associadas a fotossensibilizadores para aplicação na Terapia Fotodinâmica (TFD). A TFD é um processo que ocorre em duas etapas, a primeira envolve a aplicação de uma molécula fotossensibilizadora no local que se deseja tratar. Na segunda etapa ocorre a iluminação do local que se deseja tratar, a fim de induzir o fotossensibilizador a produzir espécies reativas de oxigênio (EROs), como o oxigênio singlete, levando à morte as células doentes [13].

Um exemplo de fotossensibilizador que pode ser utilizado na TFD é o Cloreto de Ftalocianina de Alumínio (AlClPc), que possui capacidade de produzir estados de oxigênio singlete e tripleto com altos rendimentos quânticos [13]. Contudo, como o AlClPc apresenta caráter hidrofóbico, ele pode estar associado a um nanosistema para proporcionar melhor dispersão em ambiente fisiológico. Em um estudo anterior, o AlClPc foi ancorado com sucesso em micelas que compunham o coloide formado pelo copolímero tribloco Pluronic® F-127 (PLU), que apresenta em sua cadeia polimérica ((PEO)<sub>100</sub>(PPO)<sub>65</sub>(PEO)<sub>100</sub>) uma parte polar-(PEO: poli(óxido de etileno))-apolar (poli(óxido de propileno))-polar-(PEO: poli(óxido de etileno)) [13,14].

As AuNPs, devido às suas características, vêm sendo investigadas para aplicação como agentes de contraste em tomografia computadorizada (TC). A tomografia computadorizada de raios-X é um técnica de visualização de imagem de certos órgãos e tecidos do corpo, e o emprego de contraste proporciona uma melhora na visualização da condição fisiológica dos pacientes [15]. O uso das AuNPs como agente de contraste em TC está associado à características como biocompatibilidade e resposta eletrônica adequada quando estão sob um feixe de raios-X incidente [16].

Apesar de muitas pesquisadas de AuNPs para aplicações na área biomédica, existem poucos estudos que avaliam o efeito da administração durante a prenhez [17]. Dependendo da via de administração (caudal, intraperitoneal e oral), da composição e do tamanho, as AuNPs podem atravessar a barreira placentária e entrar na circulação fetal. Portanto, a investigação sobre os possíveis efeitos toxicológicos e de teratogenicidade sobre a saúde materno-fetal é necessária para

que as aplicações sejam efetuadas com segurança [18]. Em adição, os ensaios de toxicidade que possam indicar se as AuNPs induzem efeitos fisiológicos adversos, impedem a embriogênese e o desenvolvimento saudável do feto, também merece investigação; bem como o estudo da sua biodistribuição no organismo materno.

Este trabalho tem o objetivo de desenvolver nanocompósitos coloidais (AuNP-PLU) formados por AuNPs e PLU, sua caracterização, e aplicações biomédicas. Foram investigados os efeitos da administração oral (pelo método de gavagem) do nanocompósito AuNP-PLU, durante a prenhez de ratas, e a verificação da segurança da utilização desta nanoformulação nas ratas e nos fetos. Em outra abordagem, o nanocompósito AuNP-PLU foi associado ao fotossensibilizador AICIPc para a realização de testes fotoquímicos para estudar a formação de EROs. Os nanocompósitos produzidos foram usados também como agentes de contraste em TC.

Este trabalho está organizado da seguinte forma, no primeiro capítulo encontra-se a introdução, objetivos, justificativa e motivação da pesquisa. No segundo, a revisão bibliográfica sobre nanoestruturas de ouro e aplicações. O terceiro, apresenta os procedimentos experimentais, materiais e métodos que foram empregados para a síntese dos nanocompósitos. O quarto capítulo apresenta os resultados e a discussão das análises feitas, enquanto o quinto capítulo descreve os resultados obtidos nas aplicações biológicas. No capítulo 6, a conclusão e perspectivas com as sugestões para a continuidade da pesquisa.

## **1.1 Motivação**

O uso da nanotecnologia vem se destacando nos últimos anos, em várias áreas de estudo como engenharia de materiais, medicina e nas ciências exatas [5]. Na nanomedicina, por exemplo, as AuNPs têm sido muito investigadas, pois apresentam propriedades importantes e fácil tratamento superficial, possibilitando o direcionamento de estruturas moleculares a nível celular, além de aplicação em diagnósticos [12]. Porém, o crescente uso dos nanomateriais tem gerado preocupações com relação à sua toxicidade, que está relacionado às suas características físicas e

químicas, tais como tamanho, formato, carga, e constituição química, pois isso determina seu comportamento, processamento e metabolização pelo organismo [17]. Assim, tendo em vista a vulnerabilidade do processo reprodutivo com relação ao uso das nanopartículas, estudos sobre os efeitos materno-fetal da administração das AuNPs durante a prenhez foi conduzido.

A TC é uma técnica de obtenção de imagens clínicas não invasiva, muito utilizada no diagnóstico de doenças. Ela fornece informações anatômicas sobre tecidos e órgãos e sistemas específicos como o gastrointestinal e o cardiovascular [15]. Porém, quando esta técnica é comparada a outras técnicas de obtenção de imagens clínicas, como a ressonância magnética nuclear, apresenta menor sensibilidade, indicando a necessidade do uso de contrastes para melhor visualização dos órgãos. Assim, as AuNPs apresentam as características adequadas para serem empregadas como agentes de contraste na TC, devido à atenuação dos raios-X, alto número atômico do ouro e biocompatibilidade dos nanocompósitos [16].

A TFD é uma técnica fototerapêutica, com poucos efeitos colaterais, de baixo custo, que utiliza a aplicação de um fotossensibilizador, no alvo terapêutico, que é ativado por uma fonte de luz de comprimento de onda adequado para geração de oxigênio singlete reativo, promovendo a morte de células neoplásicas [13]. Este tratamento foi aprovado para vários tipos de câncer. Neste estudo, as AuNPs serão associadas ao fotossensibilizador AICIPc, e comparadas ao controle contendo apenas micelas de PLU.

## **1.2 Justificativa**

O desenvolvimento dos nanocompósitos AuNP-PLU é advindo de uma nova rota de síntese, mais simples, rápida, com menor custo e menor geração de resíduos do que os métodos tradicionais de obtenção de nanopartículas de ouro desenvolvidos por Turkevich e Brust [19, 21]. O PLU utilizado na síntese é aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA). Em um estudo anterior, a viabilidade de células *in vitro* (linhagem celular de fibroblastos murinos (NIH-3T3)) foram encubadas com estes nanocompósitos AuNP-PLU, empregando o protocolo MTT, cujo

resultado mostrou que o tratamento não promoveu alteração na viabilidade celular nas concentrações testadas [20]. Portanto, neste estudo o nanocompósito AuNP-PLU será utilizado em testes visando aplicações biomédicas.

### **1.3 Objetivos**

#### **1.3.1 Objetivo geral**

O desenvolvimento do nanocompósito coloidal (AuNP-PLU), sua caracterização, visando estudar os efeitos da sua administração oral durante a prenhez de ratas e verificar a segurança da sua utilização no organismo materno-fetal. Este NC será testado como agente de contraste em TC em comparação um contraste de uso comercial hospitalar Optiray 320. Em outra abordagem, os NCs produzidos serão associados ao AICIPc, para a realização do teste fotoquímico a fim de verificar a formação de EROs.

#### **1.3.2 Objetivos específicos**

- Sintetizar os compósitos AuNP-PLU e caracterizá-los via espectroscopia no ultravioleta-visível, microscopia eletrônica de transmissão, espalhamento dinâmico de luz, potencial zeta, espectroscopia Raman e no infravermelho;

- Administração do nanocompósito AuNP-PLU em ratas prenhas;

- Realização de estudos comparativos com os controles sobre peso, sobrevivência animal, hematologia, toxicidade materno fetal;

- Estudar o comportamento do nanocompósito AuNP-PLU como agente de contraste em tomografia computadorizada em comparação com o contraste comercial de uso hospitalar;

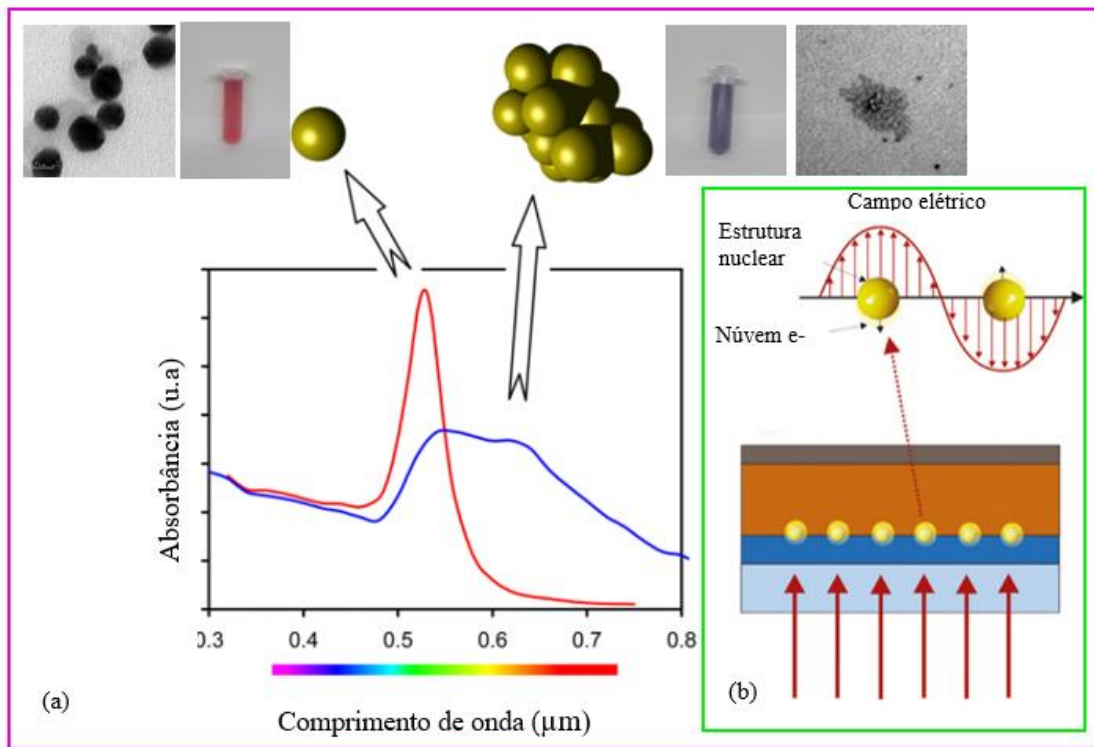
- Estudar as propriedades do nanocompósito AuNP-PLU associado ao fotossensibilizador AICIPc em teste fotoquímico com 1,3-difenilisobenzofurano.

## Capítulo 2

# Revisão Bibliográfica

Dentre os nanomateriais inorgânicos mais estudados, como nanopartículas de óxido de ferro e nanopartícula de sílica, destacam-se as nanopartículas de ouro (AuNPs), que chamam atenção devido às suas propriedades mecânicas, elétricas, térmicas, químicas e ópticas, que variam com relação ao ouro na forma macroscópica [22]. Quando estão em escala nanométrica, apresentam o efeito de ressonância plasmônica de superfície (Localized surface plasmon resonance - LSPR), que ocorre quando um campo elétrico, a uma certa frequência, induz a oscilação ressonante dos elétrons livres do metal. Sob esse efeito, a absorção pode ser acompanhada espectralmente em forma de uma banda plasmônica na região do UV-Vis [23], conforme se observa na Figura 4 – (a) e (b).

A banda de ressonância plasmônica de superfície fornece importantes informações sobre o sistema composto de NPs. Os principais fatores que influenciam a frequência de ressonância plasmônica de superfície são o tamanho, o formato da NPs, o meio no qual ela se encontra, e a interação entre as próprias partículas [68]. Quando as NPs apresentam tamanho da mesma ordem do que o comprimento de onda da luz, ocorre uma contribuição ao efeito de ressonância plasmônica. As variáveis citadas demonstram que por meio da banda de ressonância plasmônica de superfície é possível conhecer as propriedades ópticas das AuNPs de acordo com os parâmetros estabelecidos para sua síntese [68, 69]. A Figura 4 – (a) mostra uma alteração de cor, de rosa para lilás que ocorre quando as NPs (em rosa) se aglomeraram resultando no coloide lilás.



**Figura 4** – Ilustração em (a) do efeito de agregação e de frequência de ressonância. Adaptada de Louis, C. et al. [69]. Em (b) ilustração do efeito de ressonância plasmônica das AuNPs. Adaptada de Li, Y. et al. [68]. Ilustração das micrografias e AuNPs da autora.

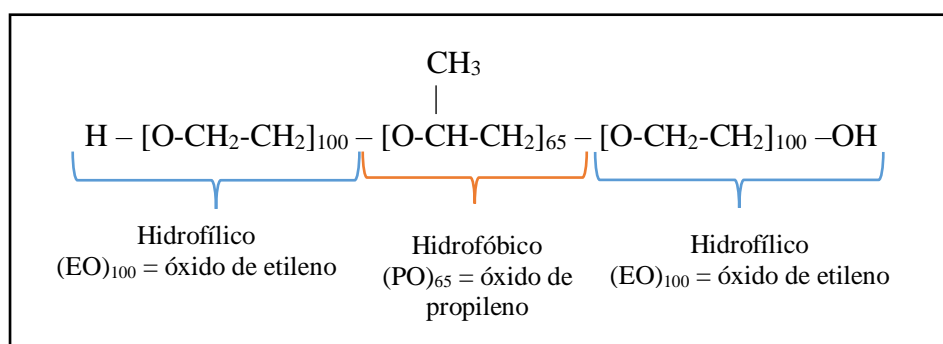
O desenvolvimento de pesquisas na síntese, caracterização e aplicação das AuNPs continua a crescer principalmente na área biomédica [5]. Como, por exemplo, nos DDS que atuam em locais específicos diminuindo os efeitos adversos, aplicação em exames de imagem, no qual as AuNPs possibilitam uma melhor visualização de órgãos e tecidos doentes, mesmo em fase inicial, quando outras técnicas já utilizadas como TC e ressonância magnética nuclear, ainda não conseguem detectar diferenças entre tecidos saudáveis e doentes [24].

As rotas de síntese mais tradicionais envolvem o uso de agentes redutores, adição de estabilizantes, apresentam tempo de reação longo com várias etapas, e o uso de reagentes de difícil descarte [25]. Por exemplo, no método de Turkevich, no qual a redução e estabilização do  $\text{HAuCl}_4$  é obtida por meio do ácido cítrico em meio aquoso, para geração das AuNPs [19, 25]. No método de Brust-Schiffrin, as nanopartículas de ouro são obtidas em duas fases reacionais, a redução do  $\text{HAuCl}_4$  é alcançada por meio da interação com grupos tiois, que estão ligados a uma cadeia carbônica externa, possibilitando a introdução de funcionalidade às nanopartículas de ouro [21, 26].

Os métodos de síntese mais simples para obtenção das AuNPs envolvem o uso de copolímeros em soluções aquosas que atuam como redutores e estabilizadores, e são consideradas

verdes. Apresentam vantagens como a baixa geração de resíduos de descarte, ocorrem a temperatura ambiente e em uma etapa “*one-pot*”, sem necessidade de purificação adicional dos reagentes. Esse método de síntese foi desenvolvido por Sakai et al [27]. Este método foi reformulado por Gomes et al [28], no qual nanopartículas de ouro são obtidas utilizando o PLU como agente redutor e estabilizador do precursor metálico, o  $\text{HAuCl}_4$ , em temperatura ambiente sob irradiação de luz UV. A formação completa das AuNPs é alcançada de forma mais rápida, cerca de 10 minutos, isto é possível por causa da velocidade de reação que foi maior utilizando o método de fotoexcitação eletrônica via luz UV. Este método de síntese também resulta em AuNPs de formato e tamanho mais uniforme do que aquelas obtidas sob luz ambiente [28].

O copolímero tribloco PLU é formado por blocos anfifílicos não iônicos de poli(óxido de etileno)–poli(óxido de propileno)–poli(óxido de etileno). Em solução aquosa, acima da concentração micelar crítica (CMC), aproximadamente  $0,6 \text{ mmol L}^{-1}$ , a determinada temperatura e concentração, os copolímeros PLU apresentam a conformação de micelas. Neste caso, o núcleo da micela é composto por cadeias hidrofóbicas de poli(óxido de propileno) (PPO), enquanto as cadeias hidrofílicas de poli(óxido de etileno) (PEO) formam a parte exterior da micela [28, 13], conforme a ilustração da Fig. 5. No caso do emprego das AuNPs em DDS à base de colóides formados por micelas poliméricas, o PLU apresenta características como solubilidade adequada à temperatura ambiente, não toxicidade e biocompatibilidade, sendo muito adequado, pois funciona como agente de redução e estabilização das AuNPs em meio aquoso.



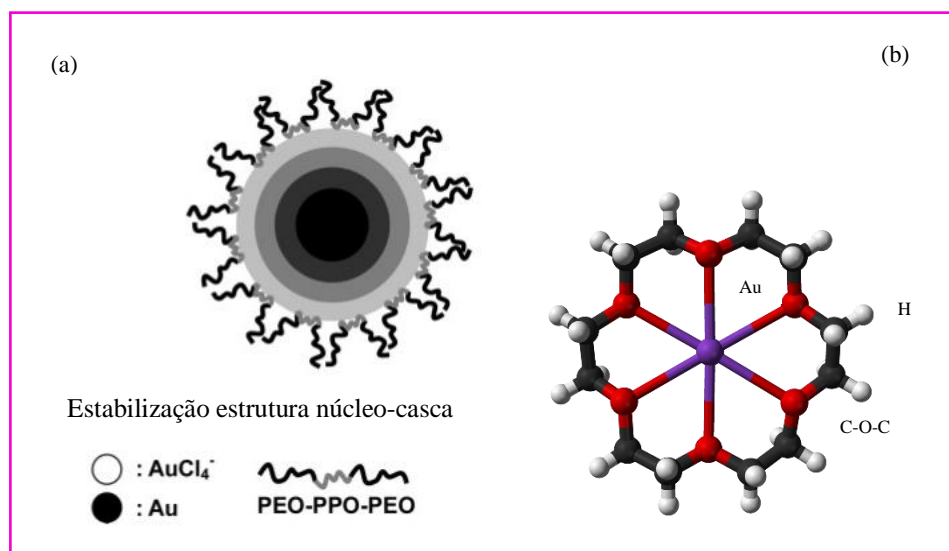
**Figura 5** – Fórmula estrutural do Pluronic® F-127. Ilustração da autora.

De acordo com os estudos propostos por Sakai, et al [57] o processo de formação das



AuNPs acontecem em três etapas. Na primeira, os íons de ouro  $\text{AuCl}_4^-$  são complexados a cadeia polimérica por meio das chamadas “coroas de éter”, onde os íons de ouro são reduzidos para  $\text{Au}^0$  e o copolímero é oxidado. A partir da formação dessa estrutura de coroa, com os núcleos formados por  $\text{Au}^0$ , os blocos hidrofóbicos (PPO) do PLU são adsorvidos na sua superfície, ocorrendo a redução dos íons restantes, assim acontece o crescimento das NPs.

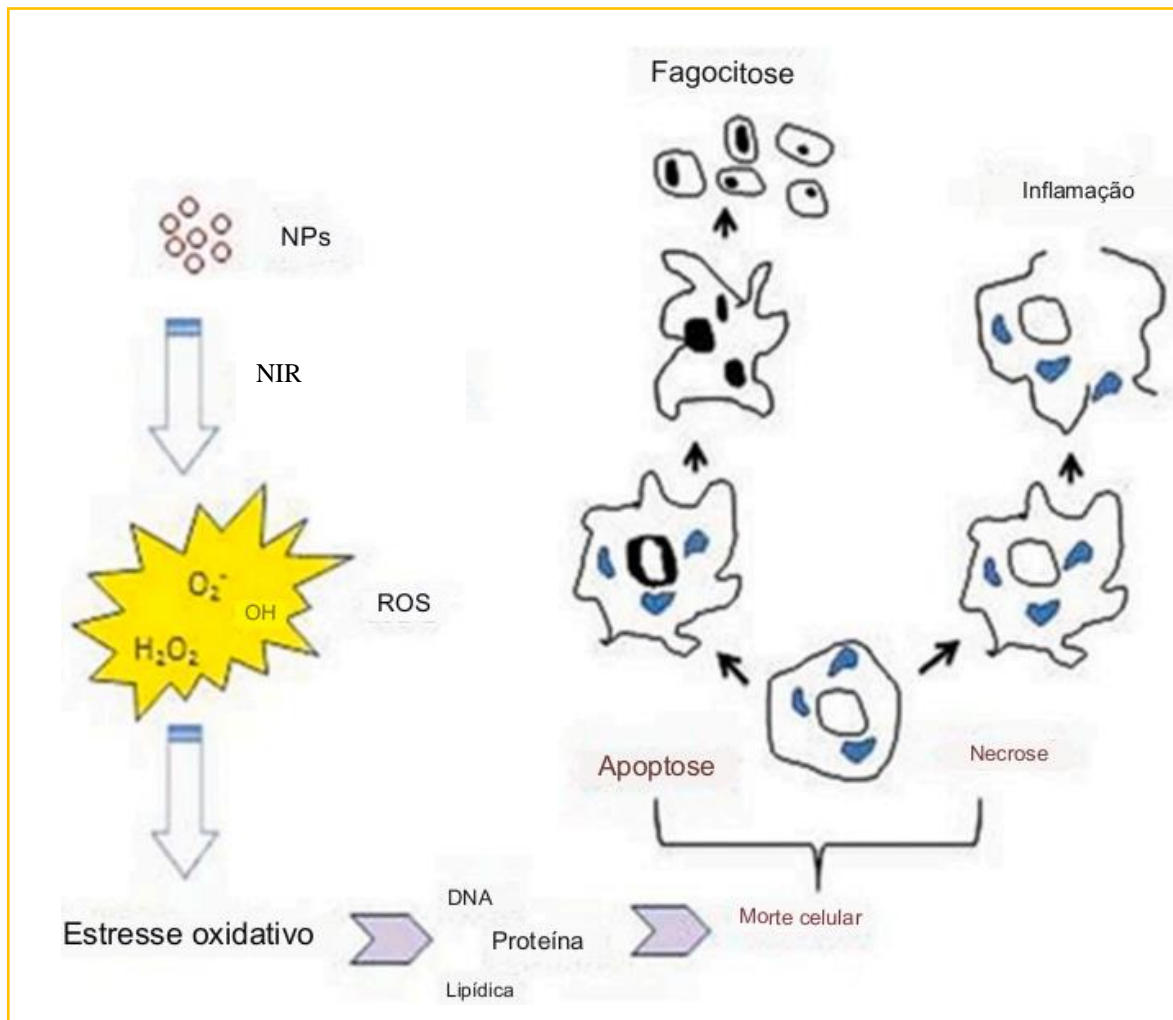
Em concentrações abaixo da CMC, as cadeias de PLU se dispersam na superfície da solução por causa da forte aversão à água sofrida pelos blocos hidrofóbicos. O contrário acontece quando a concentração de PLU fica acima da CMC, a interface ar-água apresenta estruturas auto organizadas (chamadas de micelas), que se formam espontaneamente para minimizar a energia do sistema. A conformação em micelas é advindo da aproximação dos blocos hidrofóbicos que possuem afinidade entre si, e pela parte hidrofílica que fica exteriorizada no meio aquoso proporcionando a estabilidade do sistema. Formando uma estrutura núcleo-casca (core-shell) composta pelos blocos PPO e PEO do copolímero [66]. A Figura 6 ilustra em (a) formação das AuNP-PLU na estrutura núcleo-casca. (b) ilustração da estrutura “coroa de éter”.



**Figura 6** – Ilustrações da formação de AuNPs. Em (a) formação das AuNP-PLU na estrutura núcleo-casca. Em (b) ilustração da estrutura “coroa de éter”. Adaptado de (a) Sakai, T. et al. [27], em (b) Kotlyar, S. A. et al. [70] e Lin, W. et al. [71].

As nanopartículas de ouro também podem ser associadas a fotossensibilizadores para

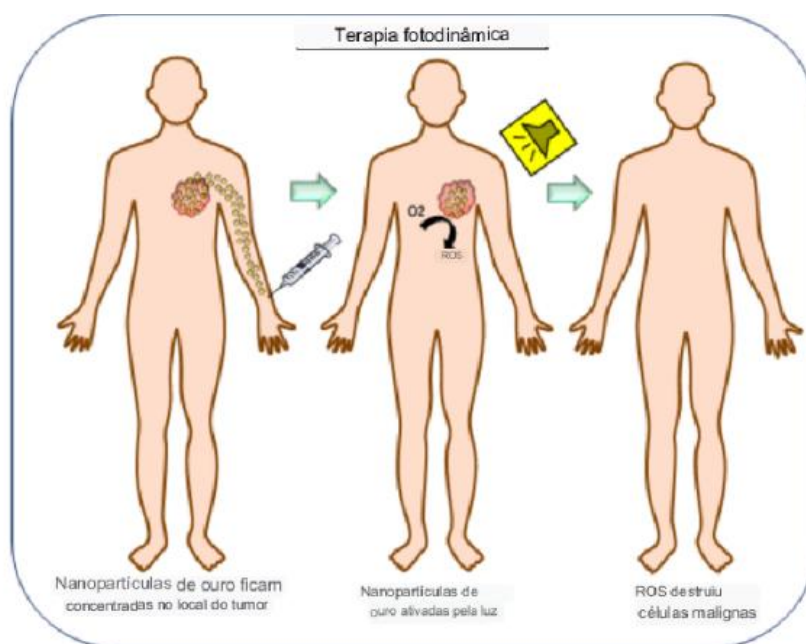
serem aplicadas em DDS na TFD [29]. A TFD é um tratamento não invasivo, aprovado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que utiliza laser de infravermelho próximo (NIR) para ativar o fotossensibilizador no local do tumor, para produzir oxigênio reativo altamente tóxico, para destruir as células tumorais, conforme ilustrado na Figura 7.



**Figura 7** – Ilustração da ação de NPs no tratamento por TFD. Adaptado de Sani, A. et al. [29].

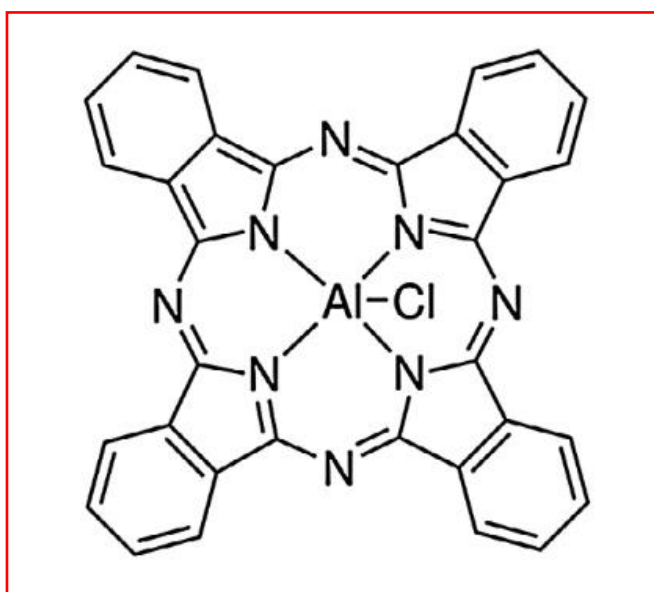
O tratamento via TFD se mostra promissor em comparação com os comumente utilizados como cirurgia, quimioterapia e radioterapia [30], pois a TFD pode atuar no local do tumor e minimizar os efeitos colaterais, pois apresenta toxicidade sistêmica leve. A TFD tem sido empregada no tratamento clínico de vários tipos de câncer, incluindo câncer de pele e câncer de esôfago [31]. Os dados de resultados encontrados na literatura mostram que a TFD repetitiva melhora significativamente a qualidade de vida e a taxa de sobrevivência dos pacientes [32]. A Fig. 8

ilustra o tratamento por TFD em humanos.



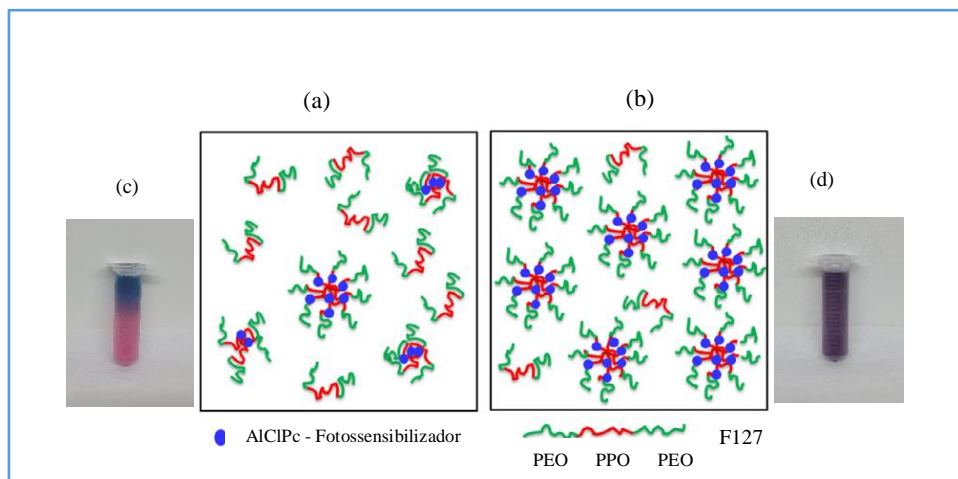
**Figura 8** – Ilustração do tratamento por TFD em humanos. Adaptado de Priyanka, S. et al. [64].

O AICIPc, é um foossensibilizador de segunda geração que apresenta características interessantes para a terapia TFD. Ele fornece forte absorção no comprimento de onda de maior penetração de luz nos tecidos ( $> 670$  nm), baixa toxicidade no escuro e alto rendimento quântico de oxigênio singlete [33]. A Figura 9 mostra a fórmula estrutural do AICIPc.



**Figura 9** – Estrutura química do Cloreto de Ftalocianina de Alumínio – AICIPc ( $C_{32}H_{16}AlClN_8$ ). Adaptada de K.R. Py-Daniel, et al [13].

A maioria dos fotossensibilizadores, inclusive o AICIPc, apresentam baixa solubilidade em água [33]. Para facilitar sua aplicação, pode-se associar o fotossensibilizador a uma nanoplataforma, de modo que tenha características biocompatíveis. Em trabalho anterior, o AICIPc, foi associado com sucesso ao coloide composto por micelas do PLU, para aplicações em TFD, de acordo com K. R. Py-Daniel, et al. [13], conforme se observa na Figura 10. A conformação micelar do PLU favorece a incorporação de outras moléculas, como fármacos e fotossensibilizadores, além de contribuir para formação de NPs [66]. Para serem obtidas, as micelas de PLU dependem de condições como solubilidade do bloco hidrofóbico e temperatura da solução. Normalmente, em concentrações acima de  $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$  de copolímero, as micelas são formadas, e possuem espaço hidrofóbico suficiente para suportar a incorporação de fármacos ou neste caso o fotossensibilizador AICIPc [13].



**Figura 10** – Ilustração do modelo de micelas de PILU-AICIPc, em (a) abaixo da CMC, e em (b) acima da CMC. Adaptada de K.R. Py-Daniel, et al [13]. Em (c) ilustração exagerada do AICIPc apresentando 2 fases, sem completa solubilização com o nanocompósito. Em (d) AICIPc completamente solubilizado com o nanocompósito, apresentando 1 fase apenas. Imagens em (c) e (d) da autora.

Estudos sobre o efeito da aplicação de AuNPs no crescimento, saúde e reprodução são essenciais, pois o desenvolvimento e implementação de produtos que incorporam NPs acontecem cada vez mais. NPs são empregadas em aplicações cosméticas, biomédicas e em outros produtos comerciais. Contudo, mulheres grávidas não são aconselhadas a utilizar este tipo de produto,

devido ao risco de transferência placentária para o feto.

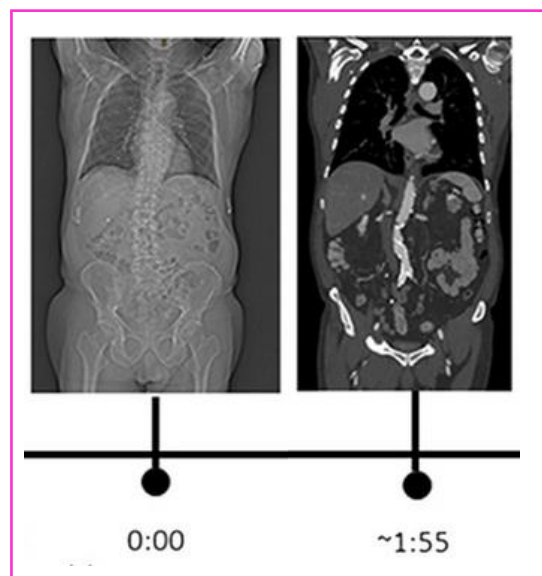
O feto é suscetível a várias substâncias tóxicas, sendo assim, é importante estudar a exposição de ratas prenhas à substâncias exógenas, incluindo nanomateriais, de acordo com Brohi, R. P. et al [34]. A placenta é o órgão responsável por conectar a circulação materna à fetal. É por lá que ocorre a troca de nutrientes, sendo assim, substâncias tóxicas também podem ser transferidas por meio desse sistema, portanto, a placenta é um local que deve ser avaliado. Embora a estrutura placentária de animais e humanos apresentem algumas diferenças, a placenta de roedores são consideradas adequadas para realização de estudos que busquem avaliar a toxicidade materno-fetal da administração das AuNPs em todas as fases da prenhez. Também é necessário avaliar os principais órgãos maternos, além de peso, tamanho e formação do feto, conforme literatura de Tsyganova, N. A. et al. [34, 35, 36].

De acordo com Zhang, X. D. et al. [40], a transferência de NPs para o feto, bem como sua toxicidade no organismo materno, está relacionada com o tamanho da NP, a via de administração, a concentração utilizada, o tempo de tratamento, e os parâmetros bioquímicos do soro. Neste caso, os órgãos maternos e a avaliação do organismo fetal são realizados para observar anomalias e formações incompletas de órgão e ossos. Contudo, foi observado por Zhang, X. D. et al. [40], que a via de administração caudal seria a mais adequada, na qual foi observada menor toxicidade no organismo materno, após a administração de AuNPs na faixa de concentração de 137,5–2200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

Neste estudo, foram realizados testes *in vivo* para investigar a toxicidade materno-fetal decorrente da administração via gavagem das AuNPs, pois elas apresentam características de tamanho, formato, viabilidade celular *in vitro*.

As AuNPs, apresentam características adequadas para serem aplicadas como agente de contraste na TC. Isto é possível devido ao seu elevado número atômico, associado à facilidade de ejetar elétrons da camada mais interna (camada K) na presença de raios-X, conseqüentemente tem-se um aumento expressivo na atenuação do feixe incidente no valor correspondente a essa energia de ejeção [37].

A tomografia computadorizada de raios-x é uma técnica de imagem utilizada para complementação de diagnóstico por meio da visualização de certos órgãos e tecidos do corpo, possibilitando caracterização minuciosa da condição dos pacientes [37, 38]. Uma forma de melhorar a definição das imagens neste exame é a utilização de agentes de contraste que funcionam como atenuantes da intensidade dos raios-X. Contudo, uma das necessidade atuais é o uso de agentes de contraste que apresentem vantagens como maior tempo de circulação na corrente sanguínea, uso de menores doses, e maior tolerância pelos pacientes em comparação com os contrastes já utilizados, o Iodo e o Gadolínio, podem promover reações adversas como urticárias, náuseas, vômitos, conforme literatura Cole, L. [38]. De acordo com Meir, R. et al [39]. As AuNPs sintetizadas podem ser estudadas como uma opção de agente de contraste na tomografia de raios-X, pois elas atendem aos requisitos quanto a baixa toxicidade, biocompatibilidade, além de apresentarem maior atenuação do que os agentes de contraste em uso. Em adição, as AuNPs podem ser manipuladas conforme a necessidade, com tamanhos e formatos adequados, bem como, podem ser usadas para marcação celular de vários tipos de células alvo [39]. A Figura 11 mostra a comparação de visualização de órgãos e tecidos entre uma imagem de TC de abdome total com contraste iodado no tempo zero e 1:55 minutos depois da administração do contraste intravenoso [72].



**Figura 11** – Ilustração da visualização dos órgãos e tecidos em uma TC de abdome total antes da aplicação do contraste iodado e 1:55 minutos depois da aplicação. Adaptado de Mergen, V. M. D. et al. [72].

## Capítulo 3

# Materiais e Métodos

Neste capítulo serão apresentados o protocolo síntese dos nanocompósitos 4.0AuNP-PLU2.0; 3.0AuNP-PLU2.0; 2.0AuNP-PLU0.5; 2.0AuNP-PLU2.0, bem como as técnicas que foram aplicadas para caracterização. Em seguida a metodologia das aplicações biomédicas realizadas (teste *in vivo*), teste fotoquímico e teste de contraste para tomografia) é relatada.

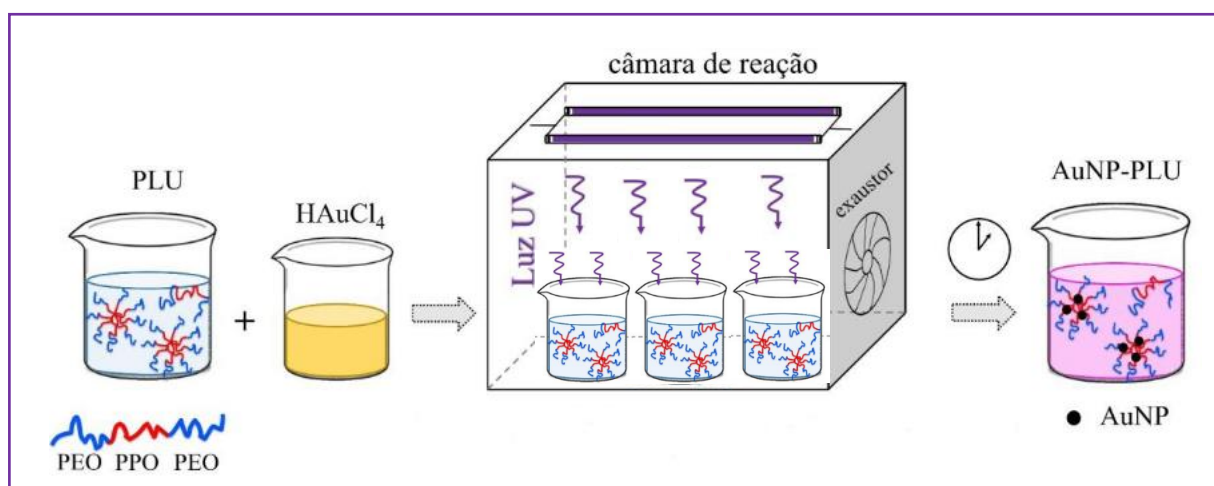
### 3.1 Materiais Empregados na Síntese dos Nanocompósitos AuNP-PLU

Os reagentes utilizados para obtenção dos nanocompósitos AuNP-PLU foram o copolímero tribloco Pluronic® F-127 de massa molar  $12.600 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , o ácido cloroáurico tri-hidratado ( $\text{HAuCl}_4\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) de massa molar  $393,83 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , e o Cloreto de Ftalocianina de Alumínio (AlClPc) - ( $\text{C}_{32}\text{H}_{16}\text{AlClN}_8$ ), de massa molar  $574,96 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Todos eles foram adquiridos da Sigma-Aldrich e utilizados sem purificação adicional.

### 3.2 Síntese dos Nanocompósitos AuNP-PLU

As soluções dos reagentes PLU e  $\text{HAuCl}_4$ , foram preparadas com água ultra-pura Mili-Q, de resistividade de  $18 \text{ M}\Omega$ . As soluções de PLU foram preparadas nas concentrações: 0,5 e 2,0  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ . As soluções de ácido cloroáurico ( $\text{HAuCl}_4$ ) foram preparadas nas concentrações: 2,0; 3,0 e 4,0  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ . O protocolo utilizado para a síntese dos nanocompósitos AuNP-PLU consiste na mistura reacional das soluções de PLU e de ácido cloroáurico com volume final de 3 mL em um béquer de 10 mL. As soluções foram colocadas em uma câmara de reação com exposição à

radiação UV (254 nm, 16 W) à temperatura ambiente, por 10 minutos para a redução do  $\text{HAuCl}_4$  e formação das nanopartículas estabilizadas com PLU em meio aquoso [28]. A Figura 12 mostra uma ilustração do processo de síntese das nanopartículas de ouro.



**Figura 12** – Ilustração do processo de síntese das AuNPs. Adaptado de Gomes, D. S. B. [55].

A formação dos nanocompósitos foi monitorada por meio da análise de espectros obtidos no ultravioleta-visível, utilizando-se o espectrofotômetro UV-Vis (UV-2600), Shimadzu Corporation (Quioto, Japão). A Tabela 1 mostra a nomenclatura dos nanocompósitos sintetizados, bem como a concentração de PLU e de  $\text{HAuCl}_4$  empregados em cada um deles.

**Tabela 1** – Nomenclatura dos nanocompósitos sintetizados e as concentrações de PLU e  $\text{HAuCl}_4$  utilizadas

Nomenclatura Amostra	[PLU] ( $\text{mmol.L}^{-1}$ )	[ $\text{HAuCl}_4$ ] ( $\text{mmol.L}^{-1}$ )
2.0AuNP-PLU:0.5	0.5	2.0
2.0AuNP-PLU:2.0	2.0	2.0
3.0AuNP-PLU:2.0	2.0	3.0
4.0AuNP-PLU:2.0	2.0	4.0

Após a síntese, os nanocompósitos foram centrifugados (ultracentrífuga no modelo Proteome-Lab XL-A/XL-I - Beckman Coulter, EUA), composta de 24 lugares para adição de



microtubos de plástico, os quais foram preenchidos com 2 mL de cada amostra (12000 rpm, a 10 °C por 120 minutos). Os nanocompósitos produzidos foram caracterizados por meio das técnicas: microscopia eletrônica de transmissão, espalhamento dinâmico de luz, potencial zeta e espectroscopia no infravermelho e Raman.

### 3.3 Preparação do sistema AuNP-PLU-AICIPc

As soluções de AICIPc foram preparadas em diferentes concentrações (0,1; 0,5 e 5 µg/mL), com o solvente orgânico etanol, banho ultrassônico de 10 minutos, na ausência de luz, segundo o protocolo descrito na literatura [13]. Posteriormente, as soluções de AICIPc foram associadas aos nanocompósitos, formando o sistema AuNP-PLU-AICIPc. Estas amostras foram empregadas em teste fotoquímicos com 1,3-difenilisobenzofurano (DPBF), para determinação das espécies reativas de oxigênio. A Tabela 2 mostra a nomenclatura dos nanocompósitos associados com o fotossensibilizador AICIPc, bem como as concentrações utilizadas.

**Tabela 2** – Nomenclatura dos nanocompósitos associados ao fotossensibilizador e as concentrações de AICIPc

Nomenclatura Amostra	[AICIPc] (µg)
2.0AuNP-PLU:0.5-0,1micg AICIPc	0,1 µg
2.0AuNP-PLU:0.5-0,5micg AICIPc	0,5 µg
2.0AuNP-PLU:0.5-5,0micg AICIPc	5,0 µg
2.0AuNP-PLU:2.0-0,1micg AICIPc	0,1 µg
2.0AuNP-PLU:2.0-0,5micg AICIPc	0,5 µg
2.0AuNP-PLU:2.0-5,0micg AICIPc	5,0 µg

### 3.4 Aplicações biológicas

Na descrição das aplicações biológicas serão detalhados os protocolos experimentais empregados para a condução dos experimentos propostos.

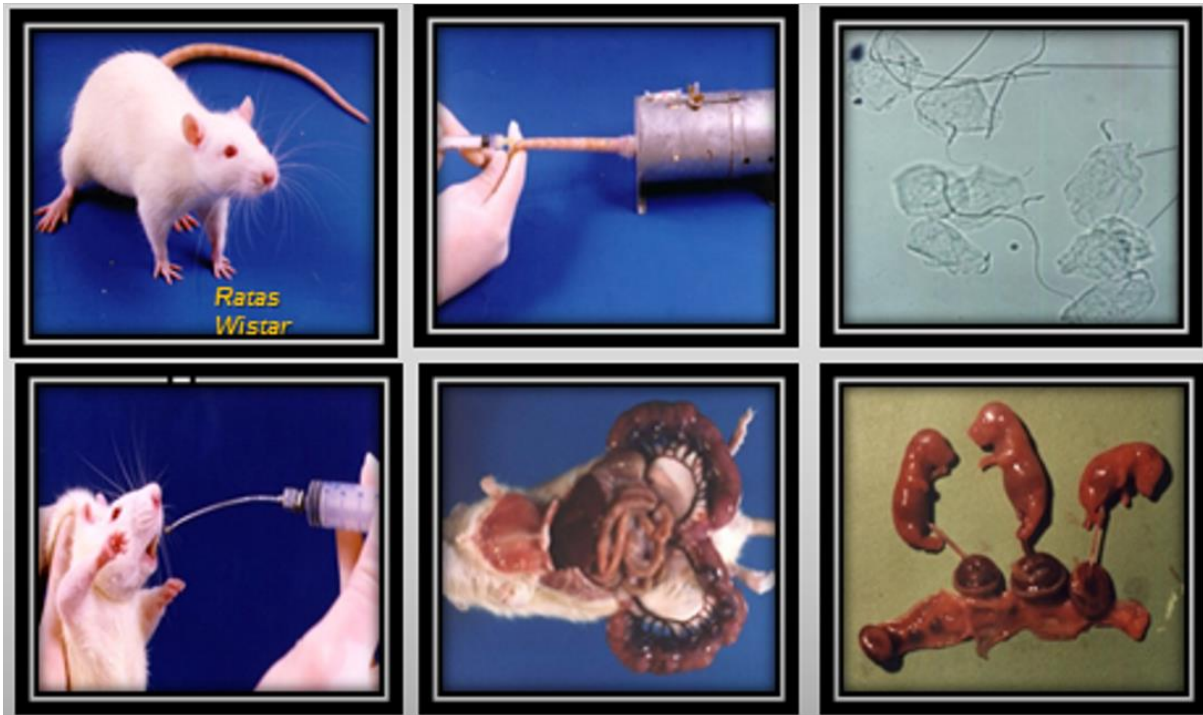
### 3.4.1 Estudo de toxicidade materno-fetal em ratas prenhas

Ratos Wistar adultos fêmeas (180-200 g) e machos (220-240 g) foram mantidos em gaiolas para três ratos com lascas de madeira autoclavadas sob condições laboratoriais padrão ( $23 \pm 2$  °C, umidade  $50 \pm 10\%$ , 12 horas de luz/ciclo escuro), com comida peletizada e água da torneira fornecida *ad libitum*. Estando de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Araguaia (Universidade Federal de Mato Grosso – UFMT / Campus do Araguaia). Número do Protocolo: CEUA 278, em reunião ordinária na data de 05/04/2019.

Após duas semanas de aclimação no biotério do Laboratório de Fisiologia de Sistemas e Toxicologia Reprodutiva da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), todas as ratas foram cruzadas durante a noite com ratos machos. O dia zero da prenhez ( $D_0$ ) foi registrado e atribuído na manhã seguinte, quando os espermatozóides foram encontrados no esfregaço vaginal [40]. As ratas prenhas foram distribuídas aleatoriamente por números aleatórios computacionais em dois grupos experimentais ( $n=12$  animais/grupo): Controle = ratas prenhas tratadas com água; Tratados = ratas prenhas tratadas com 2.0AuNP-PLU:2.0. As ratas foram tratadas com AuNP-PLU ou veículo (água) pela manhã por via intragástrica (gavagem) durante a prenhez (do 0 ao 21º dia prenhez). A seleção de dosagem de 2.0AuNP-PLU:2.0, expressa em termos de teor de Au ( $137,5 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) foi feita de acordo com a dose relatada anteriormente [40, 41], que em humanos é equivalente a  $22 \mu\text{g}/\text{kg}$  com base na área de superfície corporal (BSA) [41, 42].

Nos dias 0, 7, 14 e 21 de prenhez (às 9 h), foram determinados o peso corporal materno, o consumo de alimentos e água. No 21º dia de prenhez, as ratas foram anestesiadas com pentobarbital sódico (Thiopentax® -  $120 \text{ mg}/\text{kg}$ ). Em seguida, as ratas foram submetidas à laparotomia para exposição dos cornos uterinos. O útero gravídico foi retirado, pesado e dissecado. A porcentagem de

perda embrionária antes e depois da implantação foi calculada [43]. Os fetos e placentas foram pesados. Os fetos foram então classificados pelo peso corporal [41, 42, 43] e avaliados para determinar a presença de anomalias externas, conforme o procedimento apresentado na Figura 13.



**Figura 13** – Ilustração dos procedimentos conduzidos com as ratas. Reproduzida de Damasceno, D. C. et al. [65].

Após análise externa, metade dos fetos foi fixada em líquido de Bouin e seções seriadas foram preparadas conforme descrito conforme literatura [44] para exame visceral. Os fetos remanescentes foram preparados para exame dos esqueletos pelo procedimento de coloração conforme relatado anteriormente [45]. Além das análises esqueléticas, a contagem dos locais de ossificação foi realizada para determinar o grau de desenvolvimento fetal [46], conforme o procedimento apresentado na Figura 14.



**Figura 14** – Ilustração do procedimento para analisar as anomalias dos fetos. Reproduzida de Damasceno, D. C. et al. [65].

### 3.4.2 Tomografia computadorizada de raios-X

O nanocompósito 2.0AuNP-PLU:2.0 foi testado com objetivo de verificar a possibilidade da sua utilização como agente de contraste, em comparação com o produto comercial de uso hospitalar Optiray® 320.

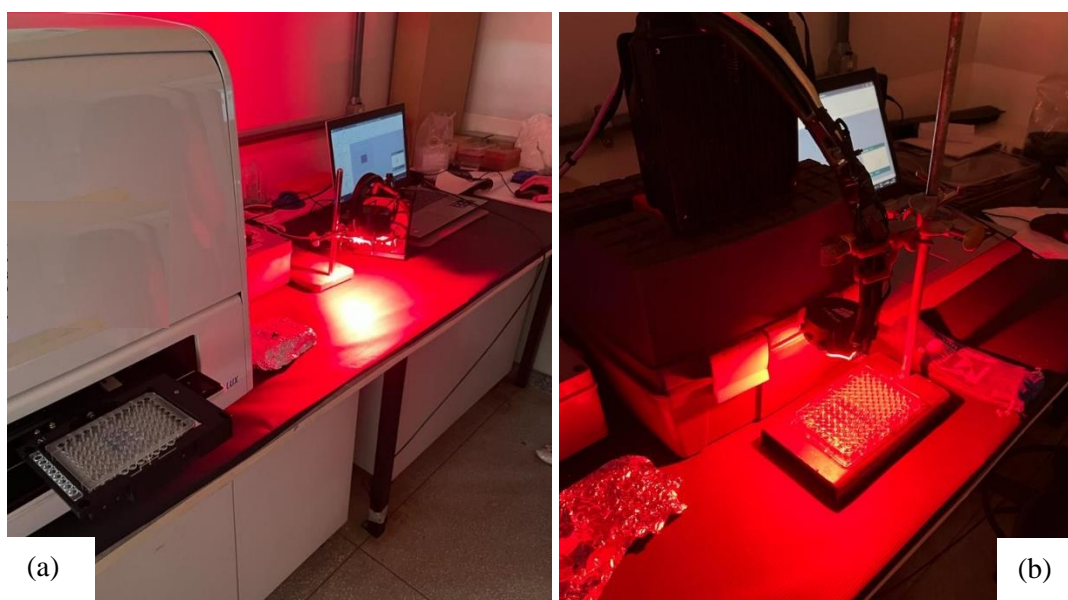
O experimento foi conduzido com o nanocompósito 2.0AuNP-PLU:2.0 com concentração de Ouro ( $\text{Au} = 1,23 \text{ mg/mL}$ ), conforme calculado a partir do resultado obtido na análise de absorção atômica anteriormente feita [55], foi comparada com Optiray@320\_1 (Liebel-Flarsheim Company LLC, Raleigh, NC, EUA (EUA) contendo Iodo na mesma concentração ( $\text{I} = 1,23 \text{ mg/mL}$ ), o experimento foi desenvolvido no Laboratório de Caracterização Tecnológica da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo-SP, Brasil. Utilizando o microscópio de raios-X 3D: equipamento Zeiss Xradia Versa XRM-510, para energias de feixe de 80, 100, 120 e 140 KV. Os coeficientes de atenuação do ar e da água deionizada foram utilizados para calibração [47].

### 3.4.3 Teste fotoquímico com DPBF e cloreto de ftalocianina de alumínio

A produção de oxigênio singlete pelos nanocompósitos foi quantificada via decomposição de DPBF conforme descrito [13], pois o DPBF reage irreversivelmente com o oxigênio singlete,

resultando na diminuição da sua absorbância que é monitorada por medidas de absorção na faixa de 360 a 450 nm.

O experimento foi conduzido com 200  $\mu\text{L}$  de cada uma das amostras e de cada um dos controles já associadas ao AICIPc em uma placa de 96 poços. Foram adicionados aos nanocompósitos e aos controles 10  $\mu\text{L}$  da solução etanólica de DPBF ( $22,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e a absorbância de DPBF foi registrada a 410 nm. A placa foi irradiada repetidamente por 10 s por uma fonte de luz LED de 660 nm com potência de  $0,04 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$ , resultando em fluência de energia de  $0,4 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$  por ciclo. Após completar 10 ciclos de irradiação, alcançou aproximadamente  $4,0 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$ , conforme se observa na Figura 15 que mostram a montagem do equipamento sem iluminação na placa em (a) e com iluminação em (b). A absorbância foi registrada após cada ciclo de irradiação para observar a degradação do DPBF na presença do fotossensibilizador AICIPc. A potência irradiada da lâmpada de LED foi determinada com um medidor de potência digital (Fieldmax II, Coherent, EUA) [13].



**Figura 15** – Montagem do equipamento para o experimento fotoquímico, em (a) placa sem iluminação, (b) placa sendo irradiação. Imagens cedidas por Torres, R.

### 3.5 Técnicas de caracterização

O desenvolvimento de nanoestruturas exige que as nanopartículas (NPs), bem como os nanocompósitos, sejam devidamente caracterizados quanto às suas características morfológicas, propriedades físico-químicas, de superfície e estabilidade ao longo do tempo de armazenamento.

A técnica de **espectroscopia no ultravioleta-visível (UV-Vis)** foi empregada neste trabalho a partir do uso do espectrofotômetro Shimadzu UV-2600, com resolução de 0,1 nm, realizando leitura na faixa de 185 a 900 nm. Os nanocompósitos foram analisados em cubetas de quartzo com 10 mm largura com o objetivo de monitorar a formação das nanopartículas de ouro (AuNP) por meio do acompanhamento da banda plasmônica de superfície de absorção do ouro, que geralmente se encontra na região entre 500 e 550 nm. Esta técnica fornece a fração de luz que é absorvida pela amostra a partir da sua exposição a uma luz monocromática que pode interagir com os elétrons de seus componentes, gerando transições eletrônicas entre seus estados de energia fundamental e excitado e assim o sinal de absorbância é obtido durante a análise. Também é possível obter dados como a concentração a partir do uso da Lei de Lambert-Beer, além de efetuar o monitoramento dos nanocompósitos com o passar do tempo [48, 54].

A técnica de **espalhamento dinâmico de luz (EDL)** foi empregada para avaliar o diâmetro hidrodinâmico ( $D_H$ ) e o índice de polidispersão (PDI) dos nanocompósitos, com base nas variações de intensidade de radiação espalhada que incide sobre a suspensão coloidal. Este feixe espalhado é captado por um detector localizado a um certo ângulo em relação ao feixe incidente [49]. Ao final, pode-se relacionar a difusão das partículas no meio, que foi determinada pelas variações na intensidade do feixe utilizado, com seu tamanho hidrodinâmico pela equação de Einstein-Stoke. O **índice de polidispersão (PDI)** indica o grau de dispersão da amostra. Quanto menor é o seu valor, mais homogênea é a distribuição de tamanho das partículas no meio. As análises foram feitas no equipamento Zetasizer Nano ZS® - Malvern Instruments.

Os dados de **potencial zeta ( $\zeta$ )** fornecem informações sobre a estabilidade das suspensões

coloidais, com base na relação da bicamada elétrica das nanopartículas. Uma camada interna que apresenta uma carga altamente ligada à partícula, e outra camada superficial de contra-íons. Assim, ao submeter o coloide a um campo elétrico externo, os íons da camada de Stern são deslocados. Dessa forma, o potencial zeta é obtido por meio do potencial eletrostático medido no plano de cisalhamento da bicamada [50]. Para ser considerado estável, o sistema coloidal deve apresentar um potencial zeta maior ou igual a 30 mV, em módulo. As medidas foram obtidas através do equipamento Zetasizer Nano ZS® - Malvern Instruments.

As imagens de **microscopia eletrônica de transmissão (MET)** fornecem informações sobre morfologia, bem como a dimensão das nanopartículas de ouro. Esta microscopia funciona a partir de uma fonte de luz de pequeno comprimento de onda, que é direcionada à amostra por meio de um filamento metálico [51]. A partir dos dados do diâmetro de um grande número de partículas, obtidos das micrografias (utilizando-se o software ImageJ), obtém-se os histogramas de distribuição de tamanho. Considerando que as nanopartículas possuem formato aproximadamente esférico, pode-se utilizar um ajuste do tipo log-normal, equação 1, para obter o diâmetro médio ( $D_{\text{méd}}$ ) e o desvio padrão do diâmetro ( $\sigma$ ).

$$P(D) = \frac{1}{D\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{\ln(\frac{D}{D_{\text{méd}}})^2}{2\sigma^2}} \quad (\text{Equação 1})$$

A **espectroscopia no infravermelho** foi utilizada neste trabalho com o objetivo de identificar os grupos funcionais presentes no copolímero tribloco PLU, nos nanocompósitos sintetizados e no fotossensibilizador. Os espectros de infravermelho foram obtidos por meio de refletância total atenuada (FTIR-ATR) no espectrômetro Varian 640IR, no qual foram colocados 10  $\mu\text{L}$  de amostra do nanocompósito ou das soluções de PLU, sobre o cristal. As medidas são obtidas após secagem do material. Esta técnica funciona a partir da absorção de radiação eletromagnética na região do infravermelho, que é observada pela alteração nos modos de vibração

e rotação naturais dos grupos funcionais presentes na molécula, podendo ser estiramento simétrico e assimétrico e dobramento fora e dentro do plano. Para que a absorção da radiação aconteça a molécula deve estar em uma frequência de vibração equivalente à radiação incidente e o seu momento de dipolo deve ser alterado [52].

A **espectroscopia Raman** foi utilizada neste trabalho para estudar a estrutura dos nanocompósitos sintetizados antes e após a associação com AICIPc e do PLU. Esta técnica permite identificar a estrutura química das amostras, por meio da interação das moléculas presentes no nanocompósito. Um feixe de laser é utilizado como fonte de excitação, gerando um espalhamento inelástico no arranjo atômico da amostra. Assim, a frequência vibracional dos átomos que compõem a amostra, é medido como um deslocamento da frequência do feixe incidente. Graficamente esses deslocamentos advindos da excitação eletrônica e liberação de fótons geram bandas e picos específicos de grupos funcionais que, posteriormente, podem ser identificados [53]. Os espectros Raman foram adquiridos na configuração micro-Raman (lente objetiva com magnificação de 50x) utilizando-se o espectrômetro LabRAM HR Evolution (Horiba Scientific, Quioto, Japão), equipado com uma CCD.



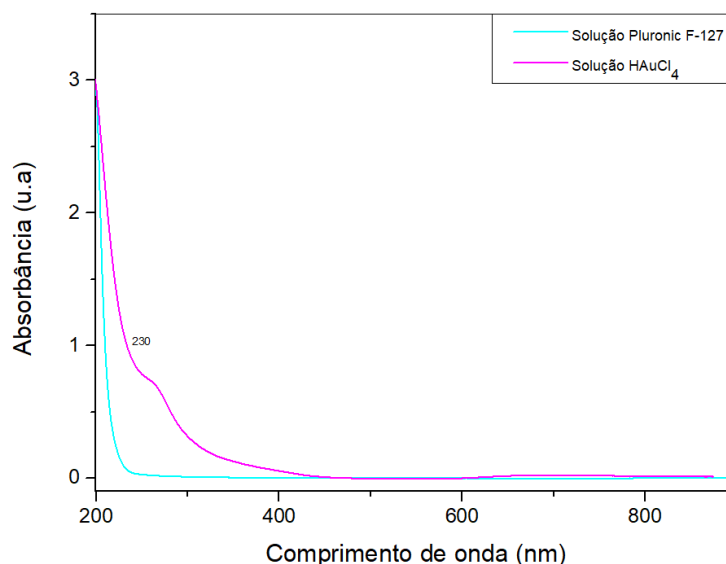
## Capítulo 4

# Resultados e Discussão

Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos da caracterização dos nanocompósitos sintetizados. Os experimentos foram conduzidos empregando-se as técnicas de espectroscopia no ultravioleta-visível, no infravermelho, e Raman, espalhamento dinâmico de luz, potencial zeta e microscopia eletrônica de transmissão.

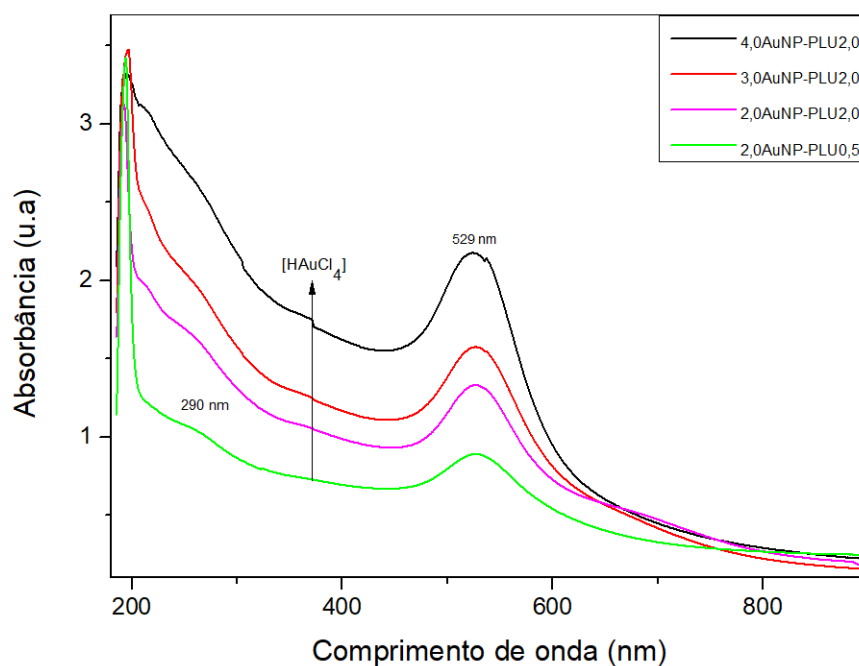
### 4.1 Caracterização dos nanocompósitos

Os nanocompósitos preparados, o precursor metálico e o PLU foram caracterizados por espectroscopia UV-Vis, cujos espectros serão apresentados a seguir. A Figura 16 se refere aos espectros dos precursores  $\text{HAuCl}_4$  e o PLU, conforme indicação. Observa-se no espectro da solução  $\text{HAuCl}_4$  uma banda em 230 nm, característico da transferência de carga entre ligante ( $\pi$ ) e o metal ( $\sigma^*$ ), conhecida como banda LMCT (transição de transferência de carga de ligante metal) [56] atribuída às espécies de Au(III) que estão presentes na solução. O PLU não apresenta transições eletrônicas na faixa de leitura medida no UV-vis.



**Figura 16** – Espectro do ultravioleta-visível do HAuCl<sub>4</sub> e do PLU

A Figura 17, mostra os espectros dos nanocompósitos 4.0AuNP-PLU:2.0; 3.0AuNP-PLU:2.0; 2.0AuNP-PLU:0.5; 2.0AuNP-PLU:2.0, na qual podem ser observadas as bandas de ressonância plasmônica de superfície característica da formação das nanopartículas de ouro entre 525 a 530 nm, dependendo da concentração de cada amostra. Comparando-se com o espectro da solução HAuCl<sub>4</sub>, observa-se um deslocamento da banda LMCT de 230 para 290 nm provavelmente relacionada à coordenação dos íons de ouro (AuCl<sub>4</sub><sup>-</sup>) aos átomos de oxigênio da cadeia do PLU [56, 57]. Observa-se também na Fig. 17 o efeito do aumento da concentração dos íons de ouro nos nanocompósito sintetizados, quando não se altera a concentração do PLU (linha preta e vermelha). Verificou-se um aumento nos valores de absorbância da banda de ressonância plasmônica de superfície, com pouca alteração de formato e posição. Para os nanocompósitos nos quais a concentração de HAuCl<sub>4</sub> se manteve fixa (2.0AuNP-PLU:0.5; 2.0AuNP-PLU:2.0), e variou-se a concentração de PLU, observa-se que quanto menor a concentração de PLU, menor intensidade da absorbância da banda de ressonância plasmônica de superfície, além de bandas mais largas.



**Figura 17** – Espectros UV-vis dos nanocompósitos 4.0AuNP-PLU2.0; 3.0AuNP-PLU2.0; 2.0AuNP-PLU0.5; 2.0AuNP-PLU2.0, conforme indicação.

A Figura 18 mostra a foto dos nanocompósitos sintetizados neste estudo, da esquerda para direita 4.0AuNP-PLU2.0; 3.0AuNP-PLU2.0; 2.0AuNP-PLU2.0 e 2.0AuNP-PLU0.5.



**Figura 18** – Foto dos nanocompósitos obtidos. Ilustração da autora.

As micrografias (MET) dos nanocompósitos foram obtidas para avaliar a morfologia e a dimensão das nanopartículas de ouro. Os histogramas de tamanho foram construídos a partir da

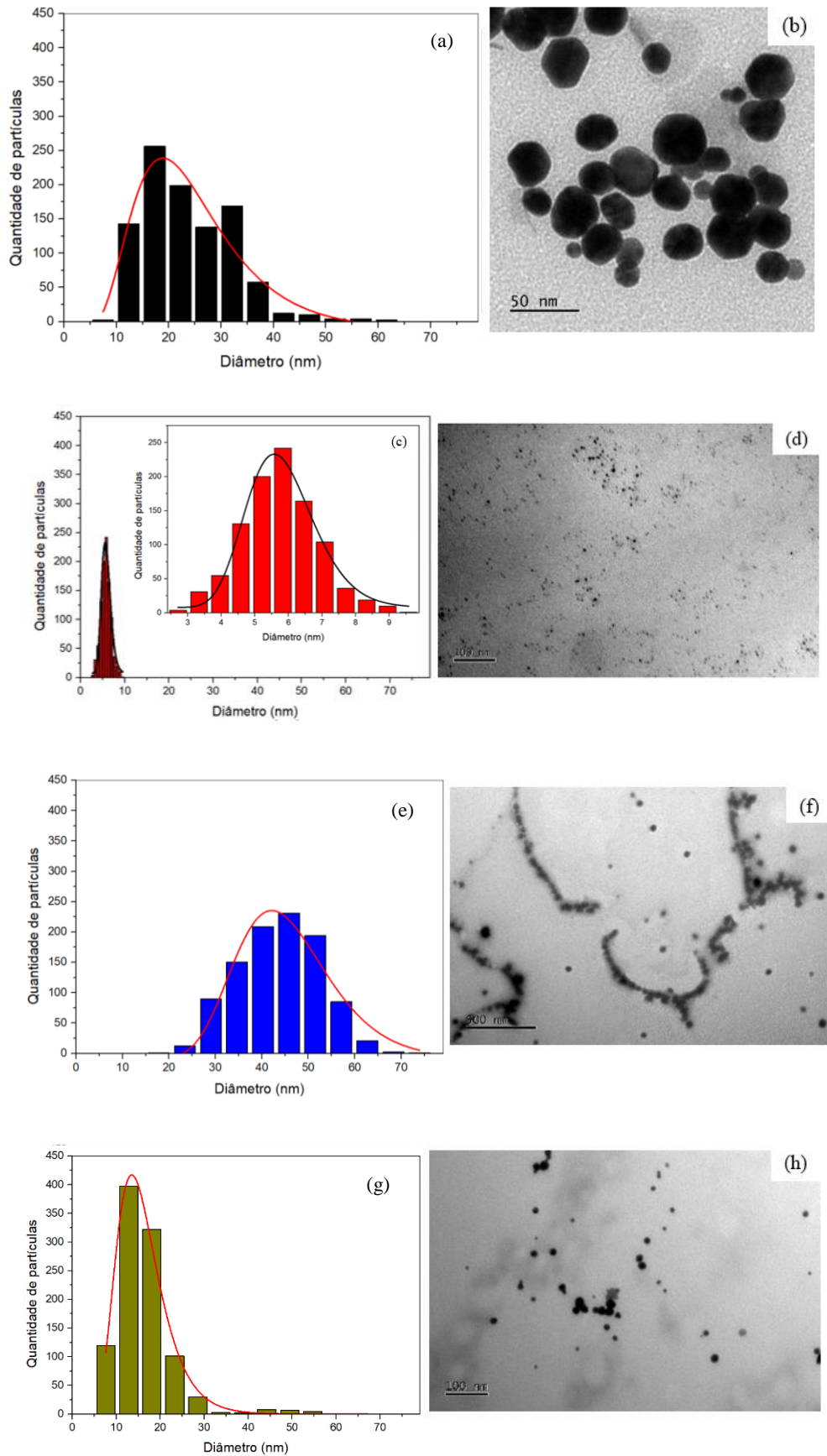
medida dos diâmetros das partículas das imagens de MET. Os dados apresentados no histograma foram ajustados por meio uma distribuição log-normal, para obtenção do diâmetro médio das partículas. Na Tabela 3 estão listados os diâmetros médios e a dispersão de tamanho ( $\sigma$ ).

**Tabela 3** – Dados do diâmetro médio ( $D_{\text{médio}}$ ) e dispersão ( $\sigma$ ) obtidos para os nanocompósitos na MET

<b>Histograma - Figura</b>	<b>Amostra</b>	<b><math>D_{\text{médio}}</math> (nm)</b>	<b>Dispersão (<math>\sigma</math>) (nm)</b>
<b>(c) - (d)</b>	2.0AuNP-PLU:0.5	5,75 $\pm$ 0,05	0,17 $\pm$ 0,01
<b>(a) - (b)</b>	2.0AuNP-PLU:2.0	22,8 $\pm$ 0,89	0,46 $\pm$ 0,03
<b>(e) - (f)</b>	3.0AuNP-PLU:2.0	44,4 $\pm$ 0,96	0,23 $\pm$ 0,02
<b>(g) - (h)</b>	4.0AuNP-PLU:2.0	15,2 $\pm$ 0,25	0,34 $\pm$ 0,01

Dados apresentados: média  $\pm$  desvio padrão, n=3.  $p < 0,05$

A Figura 19 mostra a MET das amostras sintetizadas, bem como os respectivos histogramas de quantidade de partículas em função do tamanho. As micrografias das amostras 2.0AuNP-PLU:2.0, 2.0AuNP-PLU:0.5, 3.0AuNP-PLU:2.0 e 4.0:AuNP-PLU:2.0 apresentam formato esférico, conforme se observa na Fig. 11(b), (d), (f) e (h), em concordância com os outros dados relatados na literatura [22]. De acordo com as análises do histograma da amostra AuNP-PLU:0.5, Figura (c), ela apresentou baixo índice de dispersão, podendo ser considerada quase monodispersa.



**Figura 19** – Imagem de microscopia eletrônica de transmissão dos nanocompósitos (b)-2.0AuNP-PLU:2.0, (d)-2.0AuNP-PLU:0.5, (f)-3.0AuNP-PLU:2.0, (h)-4.0AuNP-PLU:2.0

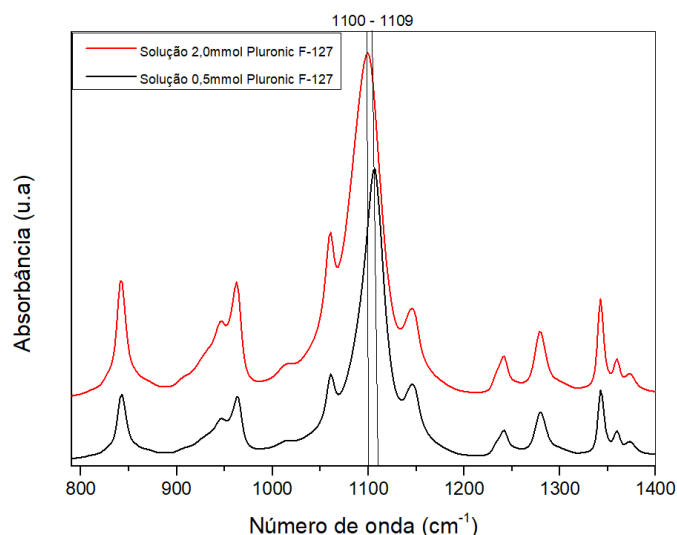
Os dados das distribuições de diâmetro hidrodinâmico obtidas por EDL das soluções de PLU e dos nanocompósitos sintetizados estão apresentadas na Tabela 4. De acordo com a literatura, os nanocompósitos de tamanhos hidrodinâmicos de aproximadamente 30 nm, indicam formação da estrutura micelar que as cadeias do PLU formam com o precursor metálico, apresentando um núcleo hidrofóbico (PPO) e a casca hidrofílica (PEO) [58]. Na Tabela 4 também estão listados os valores obtidos para o potencial zeta e índice de polidispersão.

**Tabela 4** – Diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e potencial zeta dos nanocompósitos

<b>Amostra</b>	<b>D<sub>H</sub> (nm)</b>	<b>PdI</b>	<b>ζ (mV)</b>
<b>2.0AuNP-PLU:0.5</b>	29,4 ± 0,04	0,39 ± 0,02	-0,12 ± 0,02
<b>2.0AuNP-PLU:2.0</b>	30,7 ± 0,03	0,41 ± 0,03	-0,02 ± 0,03
<b>3.0AuNP-PLU:2.0</b>	50,5 ± 0,02	0,28 ± 0,04	-0,04 ± 0,08
<b>4.0AuNP-PLU:2.0</b>	45,3 ± 0,03	0,35 ± 0,03	-0,08 ± 0,06

Dados apresentados: média ± desvio padrão, n=3. p<0,05

A técnica de espectroscopia no infravermelho, foi utilizada para estudar as mudanças estruturais que ocorreram na formação dos nanocompósitos. Para isso, foi analisado o espectro das soluções de PLU nas concentrações utilizadas de 0,5 e 2,0 mmol.L<sup>-1</sup>, na faixa de 800 a 1400 cm<sup>-1</sup>, como se observa na Fig. 20. Observa-se nesse espectro o deslocamento da banda de estiramento do grupo éter (C-O-C), localizada em 1109 cm<sup>-1</sup> quando a concentração do PLU é igual a 0,5 mmol L<sup>-1</sup> e se desloca para menores números de onda (1099 cm<sup>-1</sup>) para o regime micelar na concentração de 2,0 mmol L<sup>-1</sup>. A variação do número de onda desta banda é uma evidência da formação de micelas pelas cadeias de PLU [59]. A Tabela 5 mostra o número de onda dos picos observados e do modo vibracional das principais bandas observadas na Figura 20 [52, 59].



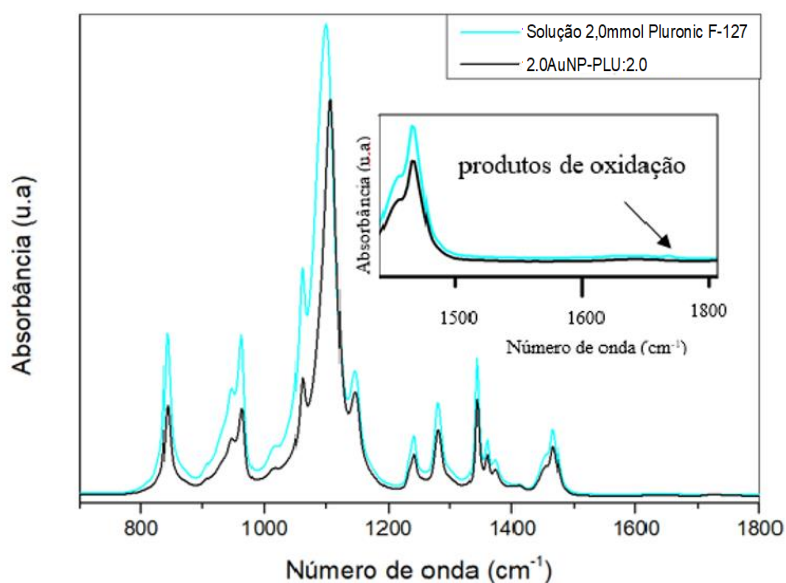
**Figura 20** – Espectros no infravermelho do PLU nas concentrações 0,5 e 2,0 mmol.L<sup>-1</sup>, conforme indicação.

**Tabela 5** – Identificação das principais bandas no infravermelho da solução PLU

Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Atribuição
1375	Dobramento simétrico CH <sub>3</sub>
1360	Dobramento simétrico fora do plano CH <sub>2</sub> Estiramento C-C
1345	Dobramento simétrico fora do plano CH <sub>2</sub>
1280	Dobramento assimétrico fora do plano CH <sub>2</sub>
1243	Dobramento assimétrico fora do plano CH <sub>2</sub>
1150	Estiramento C-O-C Estiramento C-C
1100 - 1109	Estiramento C-O-C
1070	Estiramento C-O
968	Dobramento assimétrico no plano CH <sub>2</sub>
943	Dobramento assimétrico no plano CH <sub>2</sub> Estiramento C-O-C
847	Dobramento C-H fora do plano

O espectro no infravermelho do nanocompósito 2.0AuNP-PLU:2.0 foi comparado com a solução de PLU na mesma concentração de 2,0 mmol.L<sup>-1</sup> (Fig. 21). É possível observar o deslocamento referente ao estiramento do grupo éter (C-O-C) para menores números de onda. Isso pode estar relacionado à presença de nanopartículas coordenadas ao grupo. Verifica-se, também, uma pequena banda em 1750 cm<sup>-1</sup> possivelmente associada ao estiramento C=O de aldeídos ou

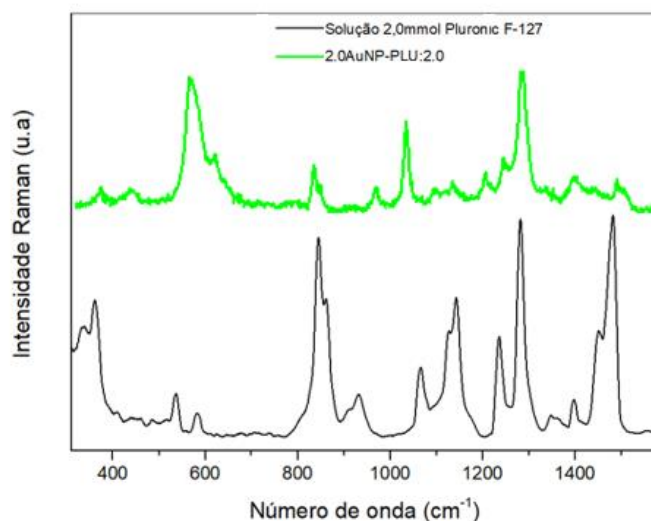
ácido carboxílico, indicando a oxidação do polímero quando na presença dos íons  $\text{AuCl}_4^-$ .



**Figura 21**– Espectro no infravermelho do nanocompósito 2.0AuNP-PLU:2.0 e do PLU conforme indicação

Observa-se no espectro Raman da solução de  $2,0 \text{ mmol.L}^{-1}$  de PLU (Fig. 22), a banda em  $1490 \text{ cm}^{-1}$  que pode ser associada à deformação nas ligações C-C presentes na estrutura do polímero, bem como pico em  $1300 \text{ cm}^{-1}$  referente a ligação C- $\text{CH}_3$  da parte hidrofóbica da cadeia polimérica. Na mesma figura, também se observa os picos abaixo de  $600 \text{ cm}^{-1}$  que estão relacionados ao estiramento das ligações C-O e o pico em  $850 \text{ cm}^{-1}$  referente às ligações C- $\text{CH}_2$  no PLU [53].



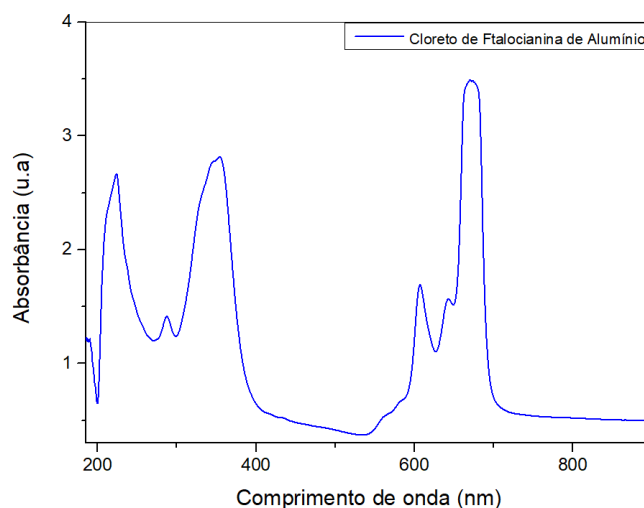


**Figura 22** – Espectro Raman do nanocompósito 2.0AuNP-PLU:2.0 e do PLU

Na Fig. 22 também se observa o espectro do nanocompósito 2.0AuNP-PLU:2.0 com uma intensa banda Raman deslocada para  $600\text{ cm}^{-1}$  que, em comparação com o espectro do PLU puro, era menor, sugerindo que as nanopartículas de ouro estão ligadas na estrutura do polímero por meio de seus átomos de oxigênio [52]. Além de pico em  $1300\text{ cm}^{-1}$  referente à deformação da ligação C-CH<sub>3</sub> da parte hidrofóbica da cadeia polimérica com os íons de ouro do meio aquoso. Enquanto a banda em torno de  $1100\text{ cm}^{-1}$  pode ser associada ao estiramento das ligações C-CH<sub>2</sub> presentes no nanocompósito que apresentam menor intensidade em comparação com a solução de PLU puro na mesma concentração. Outros picos que no espectro do copolímero puro eram mais evidentes, no espectro do nanocompósito se tornaram menores, como aqueles que estão na região acima de  $1400\text{ cm}^{-1}$ . Por exemplo o pico intenso que é visto no espectro do PLU em  $850\text{ cm}^{-1}$ , que se refere ao estiramento das ligações C-O, mas que se mostra menos intenso no espectro do nanocompósito.

#### 4.6 Caracterização do sistema AuNP-PLU-AICIPc

A Fig. 23 mostra o espectro UV-Vis do AICIPc, onde se observam as bandas em 680 nm, 650 nm 600 nm, 380 nm, 300 nm e 250 nm, características de ftalocianinas. Essas bandas são atribuídas às transições entre orbitais  $\pi$  para  $\pi^*$  do seu anel conjugado principal. A banda observada em 300 nm é chamada de banda B (Soret), enquanto a banda observada em 680 nm é chamada de banda Q. Esta banda Q (600 nm) é advinda das transições entre o estado fundamental  $A_{1g}$ , e o estado excitado singlete  $E_u$  [60].

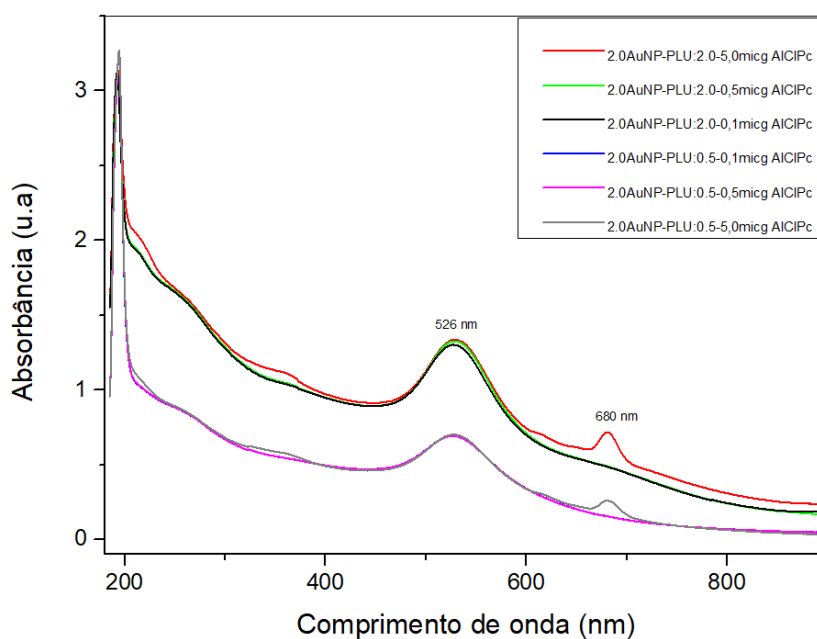


**Figura 23** – Espectroscopia UV-vis do Cloreto de ftalocianina de alumínio

Após a síntese, uma alíquota dos nanocompósitos 2.0AuNP-PLU:0.5 e 2.0AuNP-PLU:2.0 foi misturada a uma solução de AICIPc em três concentrações diferentes, 0,1; 0,5 e 5,0  $\mu\text{g}$ , formando os nanocompósitos empregados nos experimentos.

A Figura 24, apresenta os espectros das amostras, nos quais se observa o pico característico do fotossensibilizador em 680 nm além da banda associada à formação das AuNPs em 526 nm. Quando se compara os espectros do nanocompósito contendo AICIPc (Fig. 24) com o da AICIPc pura (Fig. 23), a banda característica da AICIPc surge apenas para a amostra na qual adicionou-se

5,0  $\mu\text{g}$  do fotossensibilizador. Em concentrações menores 0,1  $\mu\text{g}$  e 0,5  $\mu\text{g}$  não é possível observar diferenças significativas.



**Figura 24** – Espectroscopia no UV-vis das amostras associadas ao fotossensibilizador Cloreto de falocianina de alumínio

Após a mistura dos nanocompósitos com o AICIPc, a distribuição de diâmetro hidrodinâmico, o índice de polidispersão e o potencial zeta foram medidos, cujos dados são listados na Tabela 6. O diâmetro hidrodinâmico do AICIPc encontrado foi de aproximadamente 205,4 nm, em acordo com a literatura [17, 61].

A Tabela 6, mostra os diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e potencial zeta dos nanocompósitos associados com AICIPc. De acordo com a literatura [13], os tamanhos apresentados pelos nanocompósitos se mostram adequados, pois é esperado que o AICIPc esteja dentro da micela de PLU, na parte hidrofóbica da cadeia, resultando em pouca alteração em comparação com o  $D_H$  inicial dos nanocompósitos.

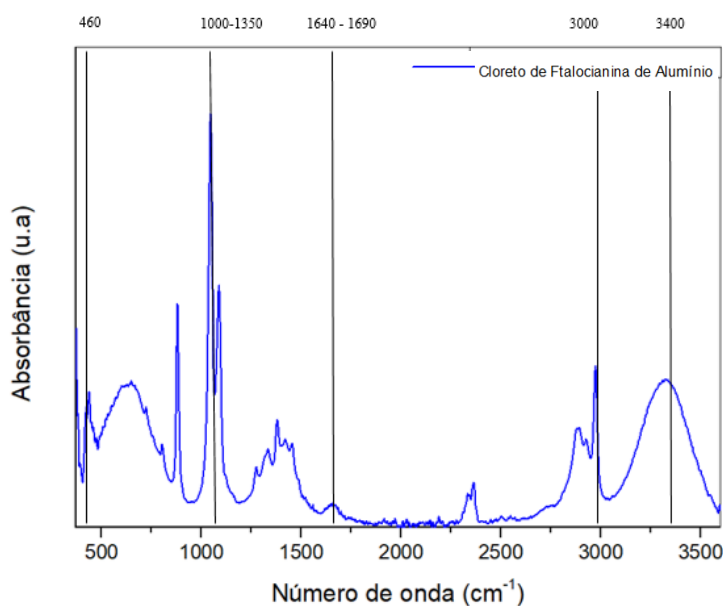
**Tabela 6** – Diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e potencial zeta dos nanocompósitos associados ao AICIPc

Amostras	$D_H$ (nm)	PdI	$\zeta$ (mV)
<b>2.0AuNP-PLU:0.5-0,1<math>\mu</math>g AICIPc</b>	29,4 $\pm$ 0,05	0,32 $\pm$ 0,03	-0,04 $\pm$ 0,02
<b>2.0AuNP-PLU:0.5-0,5<math>\mu</math>g AICIPc</b>	29,5 $\pm$ 0,02	0,29 $\pm$ 0,02	-0,03 $\pm$ 0,07
<b>2.0AuNP-PLU:0.5-5,0<math>\mu</math>g AICIPc</b>	29,7 $\pm$ 0,03	0,33 $\pm$ 0,03	-0,05 $\pm$ 0,03
<b>2.0AuNP-PLU:2.0-0,1<math>\mu</math>g AICIPc</b>	30,6 $\pm$ 0,06	0,39 $\pm$ 0,05	-0,12 $\pm$ 0,02
<b>2.0AuNP-PLU:2.0-0,5<math>\mu</math>g AICIPc</b>	30,5 $\pm$ 0,04	0,35 $\pm$ 0,04	-0,38 $\pm$ 0,05
<b>2.0AuNP-PLU:2.0-5,0<math>\mu</math>g AICIPc</b>	30,8 $\pm$ 0,03	0,38 $\pm$ 0,05	-0,75 $\pm$ 0,07
<b>Cloreto de Ftalocianina de Alumínio</b>	205,4 $\pm$ 0,045	0,41 $\pm$ 0,02	-0,82 $\pm$ 0,03

Dados apresentados: média  $\pm$  desvio padrão, n=3. p<0,05

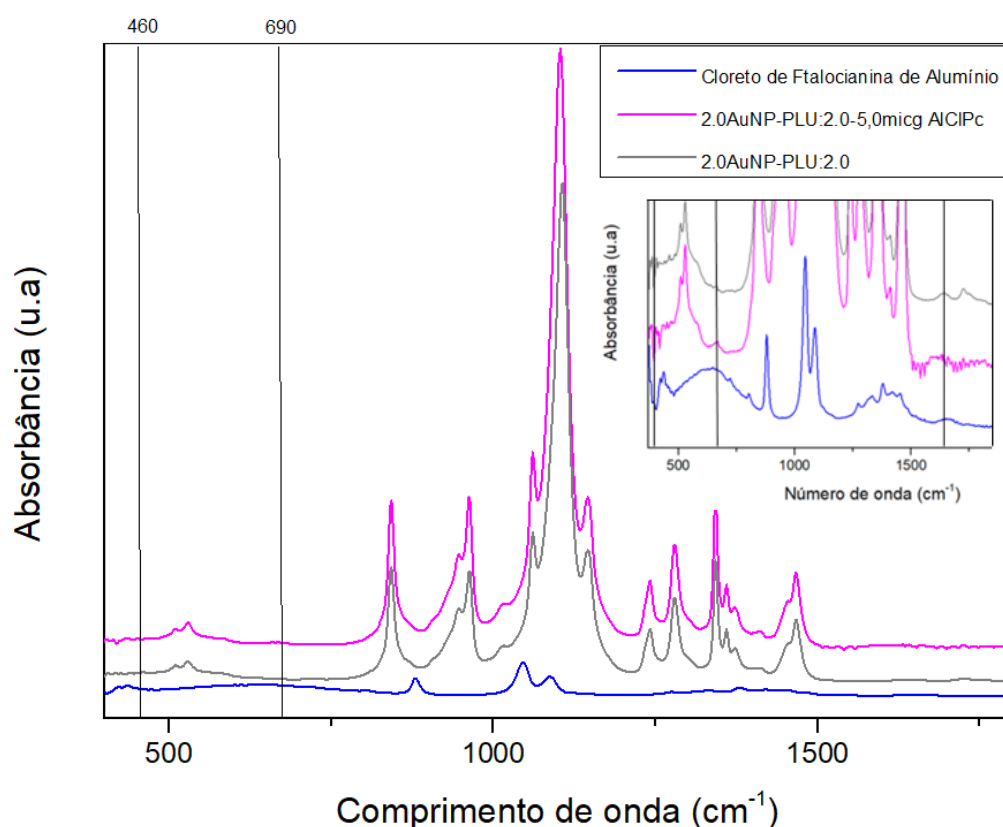
A técnica de espectroscopia no infravermelho, foi novamente utilizada, mas desta vez para estudar as mudanças que ocorreram nos nanocompósitos após a sua associação com AICIPc.

Foi analisado primeiramente o espectro do AICIPc puro, na região de 450 a 4000  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 25). Observa-se pico característico da ligação Al-Cl em 460  $\text{cm}^{-1}$ , C-N na faixa de 1000 a 1350  $\text{cm}^{-1}$ , C=N entre 1690 a 1640  $\text{cm}^{-1}$ , ligações C=C de 1600 a 1680  $\text{cm}^{-1}$ , em 3400  $\text{cm}^{-1}$ , ligação N-H, e 3000  $\text{cm}^{-1}$ , ligações C-H [52, 61].



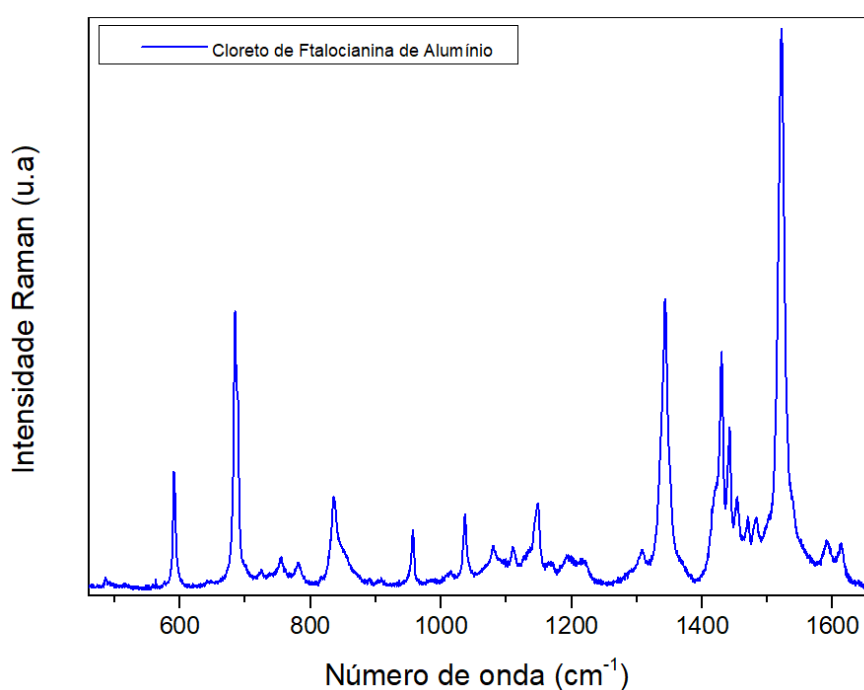
**Figura 25** – Espectro no IR-ATR do AICIPc

Os espectros apresentados na Fig. 26 mostram para comparação, os espectros do nanocompósito 2.0AuNP-PLU:2.0, e do nanocompósito associado ao fotossensibilizador 2.0AuNP-PLU:2.0-5,0 $\mu$ g AlClPc, e do AlClPc puro. Observa-se (no gráfico em destaque), um aumento na intensidade do pico em 460  $\text{cm}^{-1}$  referente à ligação ligação Al-Cl. Bem como picos na região entre 1600 a 1700  $\text{cm}^{-1}$ , possivelmente relacionados à coordenação entre o grupo éter (C-O-C) do nanocompósito aos grupos nitrogenados do fotossensibilizador [53, 60, 61, 62]. Em 690  $\text{cm}^{-1}$  apresenta-se pico referente ao estiramento fora do plano das ligações C-H do anel aromático do fotossensibilizador [52].



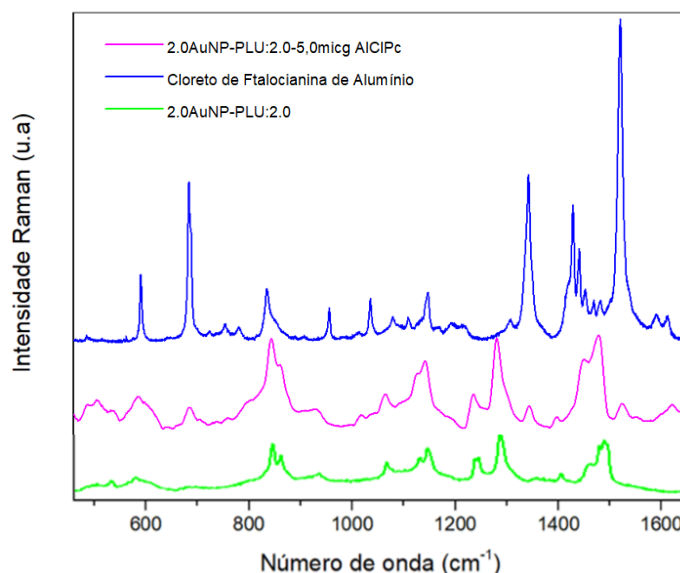
**Figura 26** – Espectro no infravermelho do nanocompósito associado ao AlClPc 2.0AuNP-PLU:2.0-5,0 $\mu$ g AlClPc, do 2.0AuNP-PLU:2.0 controle e do AlClPc

A Figura 27 mostra o Espectro Raman, na faixa de 550 a 1600  $\text{cm}^{-1}$ , do AlClPc. Observa-se em 600  $\text{cm}^{-1}$  um pico referente às ligações C-H do anel aromático presente na estrutura do AlClPc. Em 700  $\text{cm}^{-1}$ , um intenso pico associado à ligação Al-N, característico deste tipo de ftalocianina. A banda em 878  $\text{cm}^{-1}$  pode ser associada ao estiramento da ligação C-C, em 1150  $\text{cm}^{-1}$  à deformação N-H<sub>2</sub>, e na faixa de 1350 a 1450  $\text{cm}^{-1}$  à deformação associada as ligações CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>. Em adição, o pico em 1550  $\text{cm}^{-1}$  pode ser relacionado ao estiramento de ligações duplas C=C no anel aromático e em 1650  $\text{cm}^{-1}$  ao estiramento da ligação C=N [53, 61, 62].



**Figura 27** – Espectro Raman do AlClPc

Os espectros Raman do nanocompósito 2.0AuNP-PLU:2.0 puro, do AlClPc, e do 2.0AuNP-PLU:2.0-5,0 $\mu$ g-AlClPc, são apresentados na Fig. 28.



**Figura 28** – Espectro Raman dos nanocompósitos 2.0AuNP-PLU:2.0, 2.0AuNP-PLU:2.0-5,0  $\mu$ g AlClPc, e do AlClPc puro.

Observa-se na Fig. 28 uma banda em  $1350\text{ cm}^{-1}$  associado a deformação nas ligações  $\text{CH}_2\text{-CH}_3$  entre o fotossensibilizador e a cadeia polimérica do nanocompósito. Um pico em  $700\text{ cm}^{-1}$ , associado à ligação  $\text{Al-N}$ , podendo estar associado à presença de moléculas de alumínio e nitrogênio no nanocompósito.

Diferentemente do espectro do nanocompósito 2.0AuNP-PLU:2.0, que não apresenta picos após  $1500\text{ cm}^{-1}$ , o nanocompósito 2.0AuNP-PLU:2.0-5,0  $\mu$ g-AlClPc apresenta pico em  $1650\text{ cm}^{-1}$  atribuído ao estiramento da ligação  $\text{C=N}$ , que pode estar relacionado com a ligação entre os grupos nitrogenados do fotossensibilizador com a parte hidrofóbica da cadeia polimérica. Observa-se, também, um pico em  $1550\text{ cm}^{-1}$ , possivelmente relacionado ao estiramento das duplas ligações do anel aromático [53, 61, 62].

## Capítulo 5

# Aplicações Biológicas

Neste capítulo serão apresentados os resultados das aplicações biológicas dos nanocompósitos 2.0AuNP-PLU:0.5 e 2.0AuNP-PLU:2.0. Em particular, a amostra 2.0AuNP-PLU:2.0 foi selecionada para os estudos *in vivo*, porque em estudo anterior, não apresentou toxicidade para células NIH-3T3 em experimento *in vitro* empregando-se o protocolo MTT de acordo com o relatado por Gomes, D. S. B. [20]. O nanocompósito 2.0AuNP-PLU:2.0 foi administrado *in vivo*, a ratas prenhas para avaliação da toxicidade materno-fetal. Este mesmo nanocompósito foi estudado como agente de contraste na tomografia computadorizada de raios-X. Por outro lado, os nanocompósitos 2.0AuNP-PLU:0.5 e 2.0AuNP-PLU:2.0 foram utilizados em teste de estresse oxidativo, para verificar a formação de oxigênio reativo e possível aplicação em TFD.

### 5.1 Aplicação *in vivo* do nanocompósito 2.0AuNP-PLU:2.0 em ratas prenhas

Foram avaliados o peso corporal, a quantidade de ração e de água ingeridos pelas ratas que receberam a administração via oral do nanocompósito coloidal e do grupo controle. Cada grupo foi composto por 12 ratas, o grupo controle (não houve administração de 2.0AuNP-PLU:2.0) e no grupo tratado com 2.0AuNP-PLU:2.0 por 21 dias. Os resultados apresentados na Tabela 7 do dia da administração (0) e do dia 21, mostram que houve pouca diferença, menos de 5%, entre os valores médios do peso corporal, ingestão de água e de alimentos, obtidos para os dois grupos. As maiores diferenças observadas foram na média do peso corporal e da ingestão de água no 21º dia.



**Tabela 7** – Dados de peso corporal, ingestão de água e de alimentos no grupo controle e tratado

	<b>Controle</b> <b>(n = 12)</b>	<b>Tratado</b> <b>(n = 12)</b>
<b>Peso Corporal</b>		
<b>Dia 0</b>	267,5 ± 17,1	271,9 ± 24,1
<b>Dia 21</b>	389,7 ± 22,3	395,2 ± 37,7
<b>Ingestão de Alimentos</b>		
<b>Dia 0</b>	17,4 ± 2,6	18,9 ± 2,7
<b>Dia 21</b>	23,5 ± 4,2	23,8 ± 2,7
<b>Ingestão de Água</b>		
<b>Dia 0</b>	51,8 ± 9,8	51,9 ± 16,1
<b>Dia 21</b>	59,6 ± 13,2	65,1 ± 15,3

Dados apresentados como média ± desvio padrão (DP).

\* p < 0,05 – comparado ao grupo controle (teste t de Student)

Além do peso corporal, consumo de água e de ração, o peso dos órgãos como coração, fígado, baço e rim, são considerados parâmetros importantes na avaliação da toxicidade sistêmica de uma substância [41]. As concentrações aumentadas de AST e ALT no sangue são usadas como marcadores bioquímicos de danos no tecido hepático, e a ureia e a creatinina são usadas para avaliar a função renal [43]. Os dados de massa dos órgãos coração, fígado, baço e rim e os parâmetros bioquímicos do soro, dos grupos controle e tratado listados na Tabela 8 não mostraram diferenças nesses parâmetros entre os grupos, sugerindo que o tratamento feito com o coloide 2.0AuNP-PLU:2.0 não induziram toxicidade materna. O cálculo do peso relativo foi estabelecido pela relação do peso de cada órgão (em gramas) pelo peso corporal final da rata e multiplicado por 100. O resultado foi expresso em gramas/100 gramas de peso vivo (g/100g p.v.). Os dados foram expressos como média ± desvio padrão (DP). Após realização do Teste de Normalidade, os resultados paramétricos foram comparados por meio de Análise de Variância. Para a comparação

das percentagens foi utilizado o teste Exato de Fisher. Foi considerado como nível de significância estatística o limite de 5% ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 8** – Dados de massa dos órgãos coração, fígado, baço, rim e os parâmetros bioquímicos do soro no grupo controle e tratado

	<b>Controle (n = 12)</b>	<b>Tratado (n = 12)</b>
<b>Coração (g/100g)</b>	0,31 ± 0,03	0,31 ± 0,03
<b>Fígado (g/100g)</b>	3,94 ± 0,41	3,98 ± 0,31
<b>Baço (g/100g)</b>	0,22 ± 0,06	0,20 ± 0,02
<b>Rim (g/100g)</b>	0,55 ± 0,04	0,55 ± 0,03
<b>Parâmetros bioquímicos do soro</b>		
<b>ALT (U/L)</b>	41,41 ± 10,61	39,50 ± 8,79
<b>AST (U/L)</b>	145,82 ± 32,42	127,98 ± 42,13
<b>Ureia (mg/dL)</b>	45,43 ± 8,69	49,80 ± 7,70
<b>Creatinina (mg/dL)</b>	0,62 ± 0,16	0,58 ± 0,12

Dados apresentados como média ± desvio padrão (DP).

\*  $p < 0,05$  – comparado ao grupo controle (teste t de Student)

Para o sucesso da prenhes, é essencial que, durante o período de implantação, os processos fisiológicos e moleculares sejam coordenados, envolvendo interações estreitas entre o útero e o blastocisto [44]. As taxas de perda pré e pós-implantação não diferiram estatisticamente entre os grupos. Percentagem de perdas de embriões antes e depois da implantação no termo da prenhez (DP21) para ratas tratadas com água (Controle) ou AuNP (Tratadas) durante a prenhez.  $p > 0,05$  em comparação com o grupo Controle (teste Exato de Fisher) são apresentados na Tabela 9.

Os resultados maternos do tratamento oral com 2.0AuNP-PLU:2.0, listados na Tabela 7, não mostraram diferença significativa no peso corporal, ingestão alimentar, água e peso relativo dos órgãos maternos (coração, fígado, baço e rins) entre os grupos. Esses resultados podem indicar que as AuNPs não apresentaram toxicidade materna na dose administrada. Da mesma forma, as ratas do grupo tratado não apresentaram diferença nos corpos lúteos, implantação, fetos vivos e

mortos, reabsorção e porcentagem de perda pré e pós-implantação. Além disso, o peso do útero das ratas prenhas não apresentaram alteração entre os grupos. Portanto, as administrações de AuNPs não apresentam efeito deletério ao resultado reprodutivo materno.

**Tabela 9** – Dados de prenhez no grupo controle e tratado, implantação e morte fetal

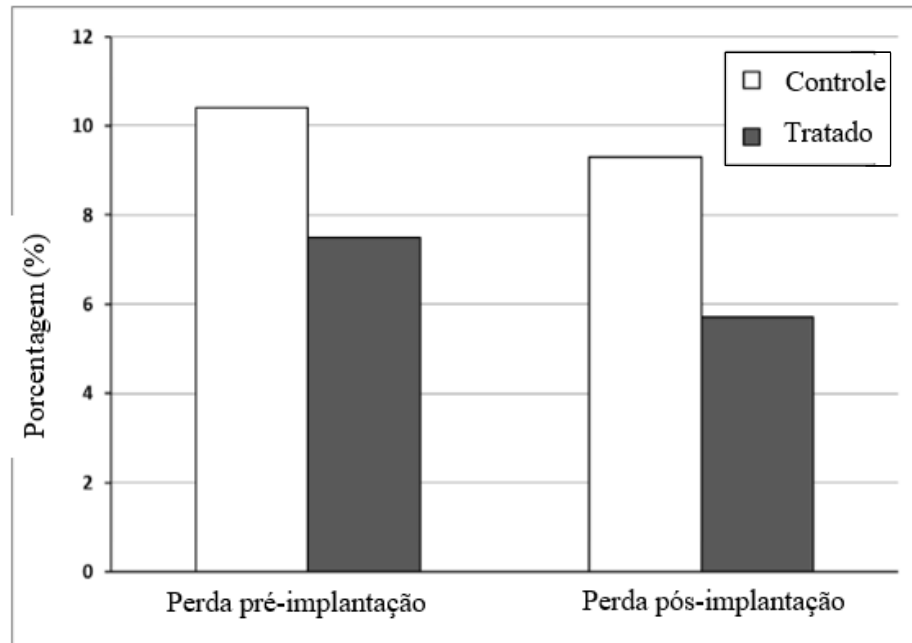
	<b>Controle (n = 12)</b>	<b>Tratado (n = 12)</b>
<b>Prenhez</b>	12	12
<b>Corpo Lúteo<sup>a</sup></b>		
<b>Total</b>	164	172
<b>Média ± DP</b>	12,7 ± 1,1	13,3 ± 1,2
<b>Implantação<sup>a</sup></b>		
<b>Total</b>	147	156
<b>Média ± DP</b>	11,5 ± 2,5	12,1 ± 1,8
<b>Fetos vivos<sup>a</sup></b>		
<b>Total</b>	136	147
<b>Média ± DP</b>	10,6 ± 2,5	11,5 ± 2,0
<b>Fetos mortos<sup>a</sup></b>		
<b>Total</b>	0	1
<b>Média ± DP</b>	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,3
<b>Reabsorção<sup>a</sup></b>		
<b>Total</b>	12	8
<b>Média ± DP</b>	1,0 ± 1,0	0,6 ± 0,5
<b>Perda pré-implantação (%)<sup>b</sup></b>	10,4	7,5
<b>Perda pós-implantação (%)<sup>b</sup></b>	9,3	5,7
<b>Ganho de peso</b>	121,1 ± 12,2	115,3 ± 19,0
<b>Peso do útero das ratas prenhas (g)</b>	72,5 ± 19,3	79,4 ± 12,1

Dados apresentados como média ± desvio padrão (DP).

\* p < 0,05 – comparado ao grupo controle (<sup>a</sup>teste t de Student; <sup>b</sup>teste exato de Fisher)

O diagrama apresentado na Fig. 29 mostra a taxa de perdas pré e pós-implante entre o grupo

que foi tratado com o nanocompósito 2.0AuNP-PLU:2.0 e o grupo controle. Os resultados mostram uma percentagem maior de perda pré e pós-implantação no grupo controle comparado com o grupo tratado.



Dados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (DP).

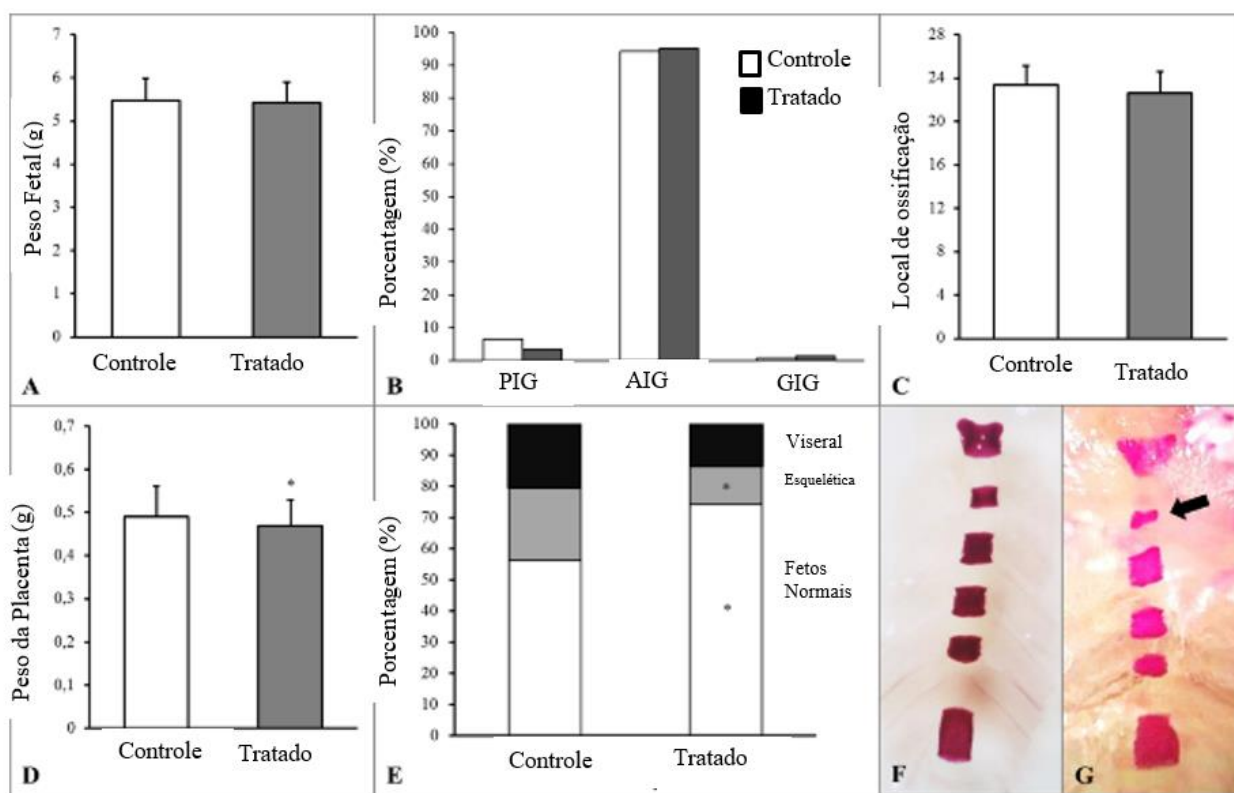
\*  $p < 0,05$  – comparado ao grupo controle (teste exato de Fisher)

**Figura 29** – Gráfico percentagem de perda pré e pós implantação nos grupos tratado e controle

Durante a prenhes, a exposição a agentes tóxicos pode levar a diferentes efeitos que vão desde alterações funcionais ou morfológicas, atraso no desenvolvimento e anomalias até a letalidade em fetos [34]. Os dados apresentados na Fig. 30 mostram o desenvolvimento fetal e placentário das ratas controle e tratadas durante a prenhez onde as partes da figura são: A - a diferença do peso fetal entre os grupos tratados e controle; B - percentagens de fetos classificados como pequenos (PIG), adequados (AIG) ou grandes (GIG) para a idade da prenhez nos dois grupos; C - locais de ossificação de fetos; D - Peso da placenta; E - Porcentagem de anomalias; F - Imagem da esternebra normal de fetos de ratos; G - Ossificação incompleta do esterno (seta). \*  $p < 0,05$  em comparação com o grupo Controle (A,C,D—Teste t de Student; B,F—Teste exato de

Fisher).

Observa-se na Fig. 30, o desenvolvimento fetal e placentário para as ratas que receberam 2.0AuNP-PLU:2.0 apresentaram diminuição no peso da placenta e na taxa de anomalias esqueléticas e aumento na taxa de fetos normais (sem anomalias). Embora o tratamento com o nanocompósito coloidal tenha diminuído o peso da placenta, essa modificação não afetou o desenvolvimento fetal em geral, indicado pela avaliação do peso fetal, classificação de peso e locais de ossificação inalterados, conforme se observa nos resultados.



\*  $p < 0,05$  – comparado ao grupo controle (<sup>A, C, D</sup>teste t de Student; <sup>B, E</sup>teste exato de Fisher)

**Figura 30** – Gráficos de comparação entre grupo tratado e controle, peso fetal e da placenta, ossificação e porcentagem de anomalias.

Na Fig. 30 se observa diferença estatística insignificante entre os dois grupos com relação ao peso fetal, e a classificação do tamanho dos fetos entre os dois grupos. Mais de 90% dos fetos apresentaram tamanho adequado. No grupo controle, foi observada uma pequena porcentagem,

menos de 10%, dos fetos foram classificados com tamanho pequeno, e cerca de 1% dos fetos do grupo tratado apresentaram tamanho grande. Com relação aos locais de ossificação, o grupo controle demonstrou melhor desempenho em comparação com grupo tratado, a diferença entre eles é menor do que 5%. O peso da placenta também apresentou uma pequena diferença na comparação entre os dois grupo, ela foi maior no grupo controle. Porém, levando-se em consideração os demais parâmetros observados, esta alteração não afetou o desenvolvimento fetal como um todo, pois importantes classificações como do peso e dos locais de ossificação permaneceram inalterados.

A avaliação das anomalias mostra que a maioria dos fetos normais, mais de 75% pertencem ao grupo tratado, enquanto 55% de fetos normais pertencem ao grupo controle, conforme os dados da Fig. 30. O grupo tratado apresenta cerca de 10% de anomalias esqueléticas, como se observa na Fig. 30 G, a ossificação incompleta do osso esterno, enquanto o grupo controle apresentou 25% dessas anomalias. Em adição, o grupo tratado apresentou 15% de anomalias viscerais, enquanto o grupo controle apresentou 20% das mesmas.

Os resultados obtidos nos testes *in vivo* de toxicidade materno-fetal em ratas prenhas revelaram que o nanocompósito 2.0AuNP-PLU:2.0 na dose de 137,5 µg/kg, é seguro tanto para a mãe quanto para o feto. Os resultados das avaliações entre o grupo controle e o tratado, mostraram que órgãos maternos estudados não apresentaram alterações significativas após a administração do nanocompósito coloidal. Dados relacionados à prenhez, como peso corporal, ingestão hídrica e alimentar, perda de fetos pré e pós-implantação, fetos vivos e mortos também foram observados com pequenas diferenças de cerca de 5%. Dados relacionados ao feto, como peso, peso da placenta, fetos com anomalias esqueléticas e viscerais e fetos normais foram comparados entre os dois grupos, com pouca diferença entre eles, não resultando em alteração no desenvolvimento dos fetos [20].

## 5.2 Aplicação do nanocompósito 2.0AuNP-PLU:2.0 em Tomografia Computadorizada de Raios-X

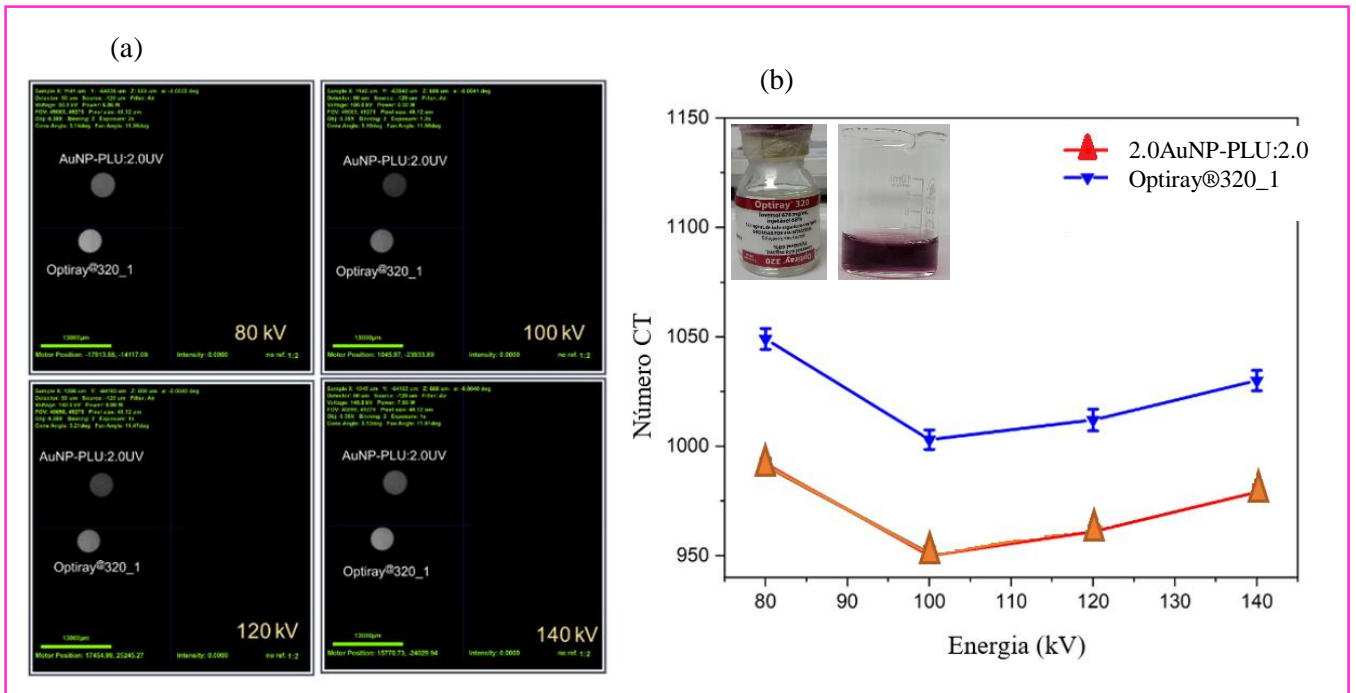
O estudo foi conduzido com o objetivo de comparar o nanocompósito coloidal 2.0AuNP-PLU:2.0 (com concentração de ouro ( $\text{Au} = 1,23 \text{ mg/mL}$ ) com o contraste comercial Optiray@320\_1 (iodo comercial padrão hospitalar) contendo iodo na mesma concentração ( $\text{I} = 1,23 \text{ mg/mL}$ ).

A Fig. 31 - A apresenta o nanocompósito 2.0AuNP-PLU:2.0 com concentração de ouro ( $\text{Au} = 1,23 \text{ mg/mL}$ ), em comparação com Optiray@320\_1 (iodo comercial padrão hospitalar) contendo iodo na mesma concentração ( $\text{I} = 1,23 \text{ mg/mL}$ ), obtida para energias de feixe de 80, 100, 120 e 140 kV. A Fig. 31 - B exibe o número de TC em função da energia do feixe para o nanocompósito 2.0AuNP-PLU:2.0 em comparação com o contraste comercial contido em iodo Optiray@320\_1, para várias energias do feixe.

Conforme se observa na Fig. 31 - B, o nanocompósito fornece contraste TC comparável ao iodo para uma mesma energia de feixe. Da mesma forma, o número de TC obtido com ambos os agentes é semelhante e diminui mais ou menos linearmente com a energia do feixe, conforme mostra a Fig. 31 - B. Observa-se que o nanocompósito 2.0AuNP-PLU:2.0 apresenta um número de TC próximo ao seu controle de iodo (Optiray@320\_1). É importante lembrar que, apesar de seu uso estabelecido, o iodo como agente de contraste pode promover efeitos colaterais indesejados, que podem variar desde uma simples alergia cutânea a efeitos mais agudos, incluindo permeação vascular e toxicidade renal [37]. Em adição, muitos pacientes não podem usar o contraste iodado quando submetidos a procedimentos de tomografia computadorizada, substituindo-se pelo gadolínio, embora este gere menor contraste em doses comparáveis [38].

O nanocompósito 2.0AuNP-PLU:2.0 apresenta capacidade de atenuação compatível do que o iodo, propiciando maior tempo de circulação, o que permite uma observação mais precisa

de vasos e tecidos [16]. Em adição, as NPs de ouro podem ser sintetizadas com revestimentos de superfície biocompatíveis e não tóxicos, que atenuam eventuais efeitos colaterais durante a administração [39]. Considerando-se que o PLU é reconhecido por sua biocompatibilidade e toxicidade insignificante, o nanocompósito coloidal 2.0AuNP-PLU:2.0 é um potencial agente de contraste para TC.



**Figura 31** – Comparação entre os contrastes Optiray@320\_1 e 2.0AuNP-PLU:2.0 nas mesmas concentrações

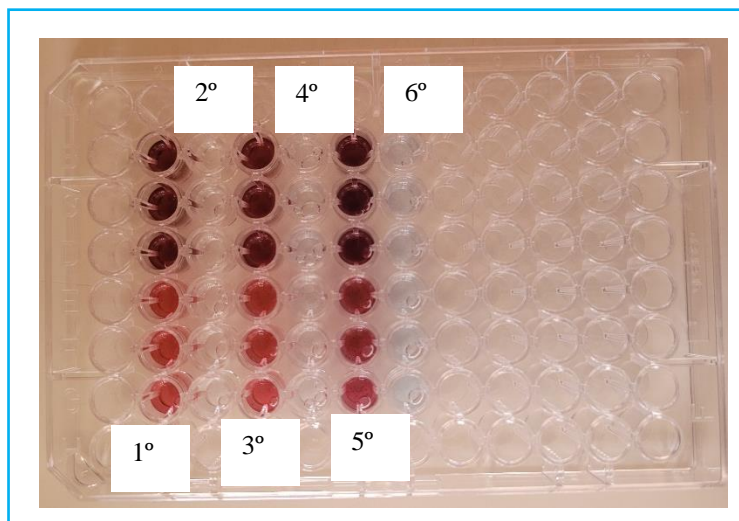


### 5.3 Aplicação dos nanocompósitos associados ao Cloreto de Ftalocianina de Alumínio

Neste estudo para a realização do teste fotoquímico com DPBF foram empregados os nanocompósitos 2.0AuNP-PLU:0.5 e 2.0AuNP-PLU:2.0 associados ao fotossensibilizador AlClPc. O experimento foi feito utilizando-se os parâmetros de tempo, comprimento de onda do LED, e montagem do equipamento descritos na referência [13].

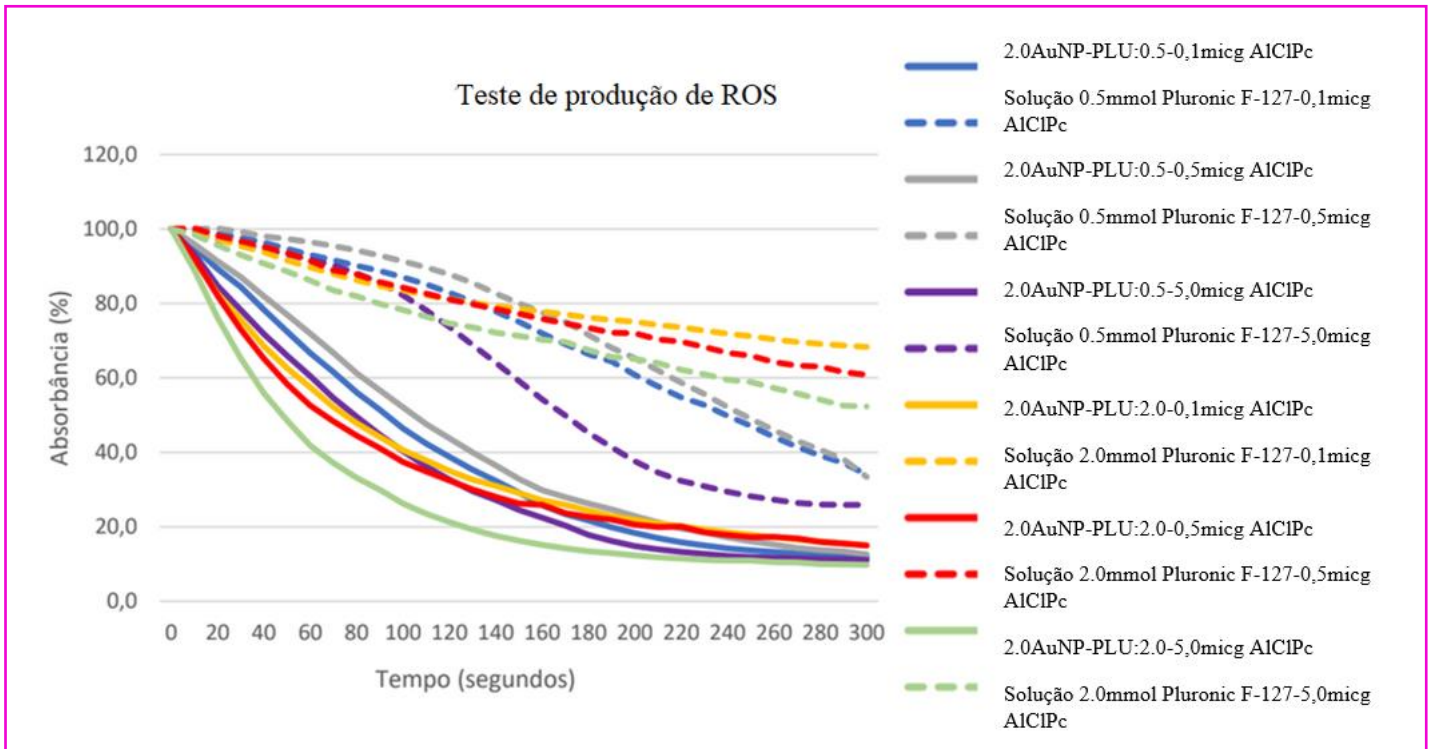
A produção de oxigênio singleto pelos nanocompósitos irradiados foi quantificada via decomposição de DPBF, pois ele reage irreversivelmente com o oxigênio singleto, que matam eficientemente as células doentes, resultando em uma diminuição da absorbância óptica do DPBF, quando se registram os dados de absorção em função do tempo. Na Figura 32 é mostrada a placa que foi utilizada no experimento com as amostras e os controles (antes da adição do DPBF). Na primeira, terceira e quinta colunas (da esquerda para direita) observa-se nas três primeiras posições em triplicata a amostra 2.0AuNP-PLU:2.0-0,1  $\mu\text{g}$  AlClPc e nas três últimas posições a amostra 2.0AuNP-PLU:0.5-0,1  $\mu\text{g}$  AlClPc. Na terceira coluna 2.0AuNP-PLU:2.0-0,5  $\mu\text{g}$  AlClPc e 2.0AuNP-PLU:0.5-0,5  $\mu\text{g}$  AlClPc e na quinta coluna a amostra 2.0AuNP-PLU:2.0-5,0  $\mu\text{g}$  AlClPc e 2.0AuNP-PLU:0.5-5,0  $\mu\text{g}$  AlClPc.

Na segunda, quarta e sexta colunas (que se encontram transparentes devido a estarem preenchidas com as soluções de PLU descritas a seguir), observa-se nas três primeiras posições as soluções controles de PLU na concentração de 2,0  $\text{mmol.L}^{-1}$  associadas ao AlClPc nas concentrações 0,1, 0,5 e 5,0  $\mu\text{g}$  respectivamente. E nas três últimas posições dessas colunas pares, observa-se as soluções controle de PLU na concentração de 0,5  $\text{mmol.L}^{-1}$  associadas ao fotossensibilizador nas concentrações 0,1, 0,5 e 5,0  $\mu\text{g}$ . É possível verificar que a última coluna da placa (da esquerda para direita), apresenta coloração azul claro, que não é possível observar nas demais colunas de soluções controles, isso se deve a maior concentração de AlClPc utilizada destes controles 5,0  $\mu\text{g}$ .



**Figura 32** – Foto dos nanocompósitos associados a AICIPc e seus controles no teste fotoquímico

Observa-se na Fig. 33 que as amostras estudadas produziram quantidade considerável de oxigênio reativo dentro do tempo estimado, a partir de 200 s até 300 s, em comparação com as amostras controle (solução de PLU com as respectivas concentrações de AICIPc de 0,1; 0,5 e 5,0  $\mu\text{g}$ ). As curvas do gráfico mostram que existe pouca diferença na produção de EROs entre as amostras, mas aquelas que apresentam uma concentração maior de PLU em sua composição (2,0  $\text{mmol.L}^{-1}$ ), produziram mais oxigênio reativo. Isso provavelmente se deve ao aumento dos sítios de ligação disponíveis no meio, possibilitando maior chance de ligação entre os grupos nitrogenados advindos do AICIPc e os grupos éter do PLU. A amostra que apresentou melhor desempenho, maior produção de oxigênio reativo no tempo estudado, foi o nanocompósito coloidal 2.0AuNP-PLU:2.0-5,0 $\mu\text{g}$  AICIPc, indicando que é uma formulação promissora para aplicação em sistemas de Terapia Fotodinâmica.



**Figura 33** – Absorbância em função do tempo no teste de produção de EROs das amostras associadas ao fotossensibilizador, sob irradiação de LED (660 nm), conforme indicação.

## Capítulo 6

# Conclusão

Neste trabalho foram sintetizados, caracterizados e aplicados com sucesso, nanocompósitos coloidais biocompatíveis, formados por nanopartículas de ouro e PLU. Os nanocompósitos foram sintetizados a partir dos precursores Pluronic®-F127 e o ácido cloroáurico, utilizando variadas concentrações de cada um deles. Os nanocompósitos sintetizados foram devidamente caracterizados por espectroscopia no UV-Vis, FTIR-ATR, Raman, Espalhamento Dinâmico de Luz, Potencial Zeta e Microscopia Eletrônica de Transmissão, e monitorados para verificar a estabilidade e a reprodutibilidade. Os resultados das caracterizações das amostras por UV-Vis e MET mostraram bandas de ressonância plasmônica entre 525 e 529 nm; AuNPs com formato aproximadamente esférico e  $D_m$  variando na faixa de 5,7 a 44,4 nm. Os espectros obtidos por IR-ATR e Raman revelaram que os íons de ouro estão coordenados ao grupo éter (C-O-C) do PLU, bem como a indicação da presença de produtos de oxidação da cadeia polimérica. Em adição, quando o fotossensibilizador AICIPc foi associado aos nanocompósitos, observou-se a banda em 680 nm, atribuída à banda Q do AICIPc, no espectro de UV-vis. Os dados de FTIR e Raman indicam a presença de grupos nitrogenados, e de moléculas de alumínio.

O nanocompósito 2.0AuNP-PLU:2.0 foi selecionado para as aplicações biológicas devido às suas propriedades adequadas como tamanho, estabilidade, formação acima da concentração micelar crítica, não toxicidade em células de fibroblasto murino (NIH-3T3). Os testes foram conduzidos *in vitro* aplicando-se o protocolo MTT. Estas características motivaram a escolha do nanocompósito 2.0AuNP-PLU:2.0 para as aplicações biológicas.

O nanocompósito selecionado foi administrado *in vivo* via gavagem, a ratas prenhas, para investigar o efeito materno-fetal, em comparação com o grupo controle. Em outra abordagem, o

nanocompósito foi investigado como agente de contraste na tomografia computadorizada de raios-X em comparação com o contraste comercial hospitalar utilizado Optiray 320. Em adição, os nanocompósitos foram associados ao fotossensibilizador AICIPc, para investigação da geração de espécies reativas de oxigênio visando aplicação em terapia fotodinâmica.

Os resultados da administração do nanocompósito 2.0AuNP-PLU:2.0 *in vivo* via gavagem a ratas prenhas, comparados com os dos animais do grupo controle (que não receberam o nanocompósito) mostraram que: os órgãos maternos como fígado, baço, rins, coração, não sofreram alterações significativas após a administração do nanocompósito; os dados relacionados à prenhez, tais como peso corporal, ingestão de água e alimentos, perda de fetos, fetos vivos e mortos, apresentaram alterações insignificantes menores do que 5%; os dados relacionados ao feto, tais como peso adequado, peso da placenta, fetos com anomalias esqueléticas e viserais e fetos normais também foram comparados entre os dois grupos com diferenças menores do 5%. Embora o tamanho da placenta tenha sido o parâmetro com maior diferença entre os grupos observados, isto não acarretou em prejuízos materno-fetais, levando em consideração os demais parâmetros que estão dentro do limite de significância. Portanto, a administração do nanocompósito 2.0AuNP-PLU:2.0 na dose de 137,5 µg/kg, é segura tanto para a mãe durante a prenhez quanto para o feto, e não tendo resultado em alteração significativa no desenvolvimento dos fetos. Portanto, o nanocompósito 2.0AuNP-PLU:2.0, se mostrou seguro para administração oral em ratas prenhas.

O nanocompósito 2.0AuNP-PLU:2.0 foi empregado como agente de contraste em tomografia computadorizada de raios-X em comparação com o contraste Optiray@320\_1 (comercial padrão hospitalar). Após análise dos dados experimentais, chegou-se à conclusão de que o nanocompósito oferece contraste comparável ao contraste comercial, para a mesma energia de feixe. Em adição, os resultados mostraram semelhança com relação ao número ct de ambos os agentes para as mesmas energias de feixe. O nanocompósito apresentou capacidade de atenuação compatível com o padrão comercial, ainda proporciona maior tempo de circulação, possibilitando

uma melhora na visualização de tecidos e vasos. Os resultados obtidos indicaram que o nanocompósito coloidal 2.0AuNP-PLU:2.0 é um potencial agente de contraste para TC.

Os nanocompósitos 2.0AuNP-PLU:2.0 e 2.0AuNP-PLU:0.5 foram associados ao fotossensibilizador AICIPc para investigação de produção de espécies reativas de oxigênio no teste fotoquímico com DPBF. Os resultados mostraram que os nanocompósitos apresentaram considerável formação de EROs dentro do tempo estudado. Principalmente a amostra 2.0AuNP-PLU:2.0-5,0  $\mu\text{g}$  - AICIPc, que produziu uma maior quantidade de espécies reativas de oxigênio neste intervalo. Dessa forma, o nanocompósito 2.0AuNP-PLU:2.0-5,0  $\mu\text{g}$  - AICIPc é uma formulação promissora para aplicação em terapia fotodinâmica.

## 6.1 Perspectivas

Para dar continuidade ao trabalho, sugere-se o estudo da produção de espécies reativas de oxigênio com e sem luz (NIR), por meio de testes *in vitro* (protocolo MTT).

Estudos *in vivo* em ratas com carcinoma mamário com o objetivo de aplicação do nanocompósito 2.0AuNP-PLU:2.0-5,0 $\mu\text{g}$ -AICIPc na Terapia Fotodinâmica.

Sugere-se a modificação da superfície do nanocompósito biocompatível 2.0AuNP-PLU:2.0, para aplicação como nanocarreador de fármacos.

## Referências Bibliográficas

- [1] Néel, Louis. Théorie du traînage magnétique des ferromagnétiques en grains fins avec application aux terres cuites. *Annales de Géophysique*, 5, 99-136, 1949. Nicholas Kurti (ed.). *Selected Works of Louis Néel*. Gordon and Breach Science Publishers. pp. 405–427. ISBN 2-88124-300-2.
- [2] Feynman, R. P. There's Plenty of Room at the Bottom. Disponível em: [https://web.pa.msu.edu/people/yang/RFeynman\\_plentySpace.pdf](https://web.pa.msu.edu/people/yang/RFeynman_plentySpace.pdf). Michigan State University.
- [3] Museu Virtual de Nanociência e Nanobiotecnologia. PUC-Rio. Disponível em: [https://www.maxwell.vrac.puc-rio.br/20185/historia\\_taniguchi.html](https://www.maxwell.vrac.puc-rio.br/20185/historia_taniguchi.html)
- [4] Tiwari, P. et al. Functionalized Gold Nanoparticles and Their Biomedical Applications, *Nanomaterials*. 1 (2011) 31–63. doi:10.3390/nano1010031.
- [5] Medeiros E. S. Et al. Nanotecnologia: introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação, in: *Nanotecnologia*, 1 ed, Artliber, São Paulo, 2012: p. 208.
- [6] Scott E. M. Nanotechnology for the biologist, *journal of leukocyte biology*. 27 May 2005. <https://doi.org/10.1189/jlb.0205074>
- [7] Louis, C. et al. *Gold Nanoparticles for Physics, Chemistry and Biology*, Imperial C, Université Pierre et Marie Curie, France, 2012.
- [8] Giljohann, D.A. et al. Gold nanoparticles for biology and medicine, *Angewandte Chemie* 49(19) (2010) 3280-94.
- [9] Mitchell, M. J. et al. Engineering precision nanoparticles for drug delivery. *Nature Reviews. Drug Discovery*. 2021 Feb; 20(2):101-124.
- [10] Boisselier, E. et al. Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. *Chemical Society Reviews*. July 2009, 38(6):1759-82.
- [11] Manaspon, C. et al. Preparation of Folate-Conjugated Pluronic F127/Chitosan Core-Shell

Nanoparticles Encapsulating Doxorubicin for Breast Cancer Treatment. *Journal of Nanomaterials*. 2011.

[12] Xu, J. et al. A general strategy towards personalized nanovaccines based on fluoropolymers for post-surgical cancer immunotherapy. *Nature Nanotechnology*. 2020-12.

[13] K.R. Py-Daniel, et al. Highly efficient photodynamic therapy colloidal system based on chloroaluminum phthalocyanine/pluronic micelles, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 103 (2016) 23–31. doi:10.1016/j.ejpb.2016.03.028.

[14] Yang, L. et al. Gold nanoparticles-mediated photothermal therapy and immunotherapy. *Immunotherapy*. 2018.

[15] Dong, Y. C. Effect of Gold Nanoparticle Size on Their Properties as Contrast Agents for Computed Tomography, *Scientific Reports* v 9, Article number: 14912 (2019)

[16] Cook, J. M. et al. X-Ray Tomography studies of wellbore processes under in situ stress conditions *International Journal of Rock Mechanics and Mining Sciences & Geomechanics Abstracts*, vol. 30(7), pp.1091- 1094, 1993.

[17] Paula, V. G. et al. Maternal-fetal repercussions of *Phyllanthus niruri* L. treatment during rat pregnancy, *Journal of Ethnopharmacology* 254 (2020) 112728.

[18] Soares, T. S. et al. Maternal-fetal outcomes of exercise applied in rats with mild hyperglycemia after embryonic implantation, *Birth Defects Research* 113 (2021) 287–298.

[19] J. Turkevich, P.C. et al. The Formation of Colloidal Gold, *J. Phys. Chem.* 57 (1953) 670–673. doi: 10.1021/j150508a015.

[20] Gomes, D. S. B. et al. Uv-Accelerated Synthesis Of Gold Nanoparticle-Pluronic Nanocomposites For X-Ray Computed Tomography Contrast Enhancement. *Polymers*, v. 15, p. 2163, 2023.

[21] Perala, S.R.K. et al. On the Mechanism of Metal Nanoparticle Synthesis in the Brust–Schiffrin Method, *Langmuir*. 29 (2013) 9863–9873. doi:10.1021/la401604q.



- [22] Nikolai, K. et al. Applications of Gold Nanoparticles and Multifunctional Nanocomposites. Analytical and Theranostic, 2013.
- [23] Khlebtsov, N. G. Optics and Biophotonics of Nanoparticles with a Plasmon Resonance. Quantum Electronics, v.38, n. 6, p. 504-529, 2008.
- [24] Withers P. J. et al. X-ray computed tomography, Nature Reviews Methods Primers volume 1, Article number: 18 (2021).
- [25] Shi, L. et al. How does the size of gold nanoparticles depend on citrate to gold ratio in Turkevich synthesis? Final answer to a debated question, J. Colloid Interface Sci. 492 (2017) 191–198. doi:10.1016/j.jcis.2016.10.065.
- [26] Chow, M.K. et al. Gold Sol Formation Mechanisms: Role of Colloidal Stability, J. Colloid Interface Sci. 165 (1994) 97–109. doi:10.1006/jcis.1994.1210.
- [27] Sakai, T. et al. Mechanism of Gold Metal Ion Reduction, Nanoparticle Growth and Size Control in Aqueous Amphiphilic Block Copolymer Solutions at Ambient Conditions. J. Phys. Chem. B. 2005.
- [28] Gomes, D. S. B. et al. New insights on the formation of gold nanoparticles and Pluronic nanocomposites: Kinetics and thermodynamics parameters. Journal of Molecular Liquids. 2018.
- [29] Sani, A. et al. Toxicity of gold nanoparticles (AuNPs): A review. Biochem Biophys Rep. 2021 Apr 10;26:100991. doi: 10.1016/j.bbrep.2021.100991. e-Collection 2021 Jul.
- [30] Wolfgang, S. et al. Singlet oxygen quantum yields of different photosensitizers in polar solvents and micellar solutions. Journal of Porphyrins and Phthalocyanines, 1999.
- [31] Teixeira, P.R. et al. Photochemically-assisted synthesis of non-toxic and biocompatible gold nanoparticles, Colloids Surfaces B Biointerfaces. 148 (2016) 317–323. doi:10.1016/j.colsurfb.2016.09.002.
- [32] Eustis, S. et al. Molecular mechanism of the photochemical generation of gold nanoparticles in ethylene glycol: Support for the disproportionation mechanism, J. Phys. Chem. B. 110 (2006)

14014–14019. doi:10.1021/jp062972k.

[33] Vilsinski, B. H. et al. Spectroscopic study of aluminum phthalocyanine chloride (alpccl) in homogeneous and micro-heterogeneous media consisting of p-123 and f-127 polymeric micelles. *Quim. Nova*, Vol. 38, No. 5, 631-639, 2015. Artigo. <http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20150056>

[34] Brohi, R. P. et al. Toxicity of Nanoparticles on the Reproductive System in Animal Models: A Review. *Front. Pharmacol.*, 05 September 2017. Sec. Predictive Toxicology. V. 8 – 2017. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00606>

[35] Rattanapinyopituk K. et al. Demonstration of the clathrin- and caveolin-mediated endocytosis at the maternal-fetal barrier in mouse placenta after intravenous administration of gold nanoparticles. *J Vet Med Sci*. 2014 Mar;76(3):377-87. doi: 10.1292/jvms.13-0512. Epub 2013 Nov 20.

[36] Tsyganova, N. A. et al. Penetration of pegylated gold nanoparticles through rat placental barrier. *Bull Exp Biol Med*. 2014 Jul;157(3):383-5. doi: 10.1007/s10517-014-2572-3. Epub 2014 Jul 29.

[37] Jain, P.K. et al. Calculated absorption and scattering properties of gold nanoparticles of different size, shape, and composition: Applications in biological imaging and biomedicine, *J. Phys. Chem. B*. 110 (2006) 7238–7248. doi:10.1021/jp057170o.

[38] Le, C. et al. Gold nanoparticles as contrast agents in x-ray imaging and computed tomography. *Nanomedicine*, v.10. n. 2, p. 321-341. 2015.

[39] Meir, R. et al. Cell tracking using gold nanoparticles and computed tomography imaging. *WIREs Nanomed Nanobiotechnol* 2018, 10:e1480. doi: 10.1002/wnan.1480.

[40] Zhang, X. D. et al. Toxicologic effects of gold nanoparticles in vivo by different administration routes, *International Journal of Nanomedicine* v. 5 (2010) 771-81.

[41] Moraes-Souza, R. Q. et al. Safety evaluation of a vaccine: Effect in maternal reproductive

outcome and fetal anomaly frequency in rats using a leishmanial vaccine as a model, Plos one 12 (2017) e0172525.

[42] Yamashita, K. et al. Silica and titanium dioxide nanoparticles cause pregnancy complications in mice. *Nat Nanotechnol* 2011;6(5):321–8.

[43] Aliverti, V. et al. The extent of fetal ossification as an index of delayed development in teratogenic studies on the rat, *Teratology* 20 (1979) 237–242.

[44] Reagan-Shaw, S. et al. Dose translation from animal to human studies revisited, *The FASEB Journal* 22 (2008) 659–661.

[45] Gallego, F. Q. et al. Pancreatic islet response to diabetes during pregnancy in rats, *Life Sciences* 214 (2018) 1–10.

[46] Mohamadzadeh N, et al. Developmental Toxicity of the Neural Tube Induced by Titanium Dioxide Nanoparticles in Mouse Embryos. *Avicenna J Med Biotechnol.* 2021 Apr-Jun; 13(2):74-80.

[47] Withers, P. J. et al. X-ray computed tomography. *Nat. Rev. Methods Prim.* 2021, 1, 18.

[48] Shimadzu, UV-VIS Spectrophotometers: UV-2600/2700, Shimadzu Corporation, Japan, 2012, instruction-manual.

[49] Zetasizer Nano Series: User manual. Reino Unido: Malvern Instruments Ltd, 250 p. 2013.

[50] Ramos, A. P. Espalhamento de Luz Dinâmico aplicado à caracterização de nanopartículas. In: roz, alessandra luiza de et al. *Técnicas de Nanocaracterização: Princípios e Aplicações.* v.3. 1 ed., Elsevier: Rio de Janeiro, 2015

[51] Farina, M. Uma introdução a Microscopia Eletrônica de Transmissão, 1 ed., Livraria da Física, São Paulo, 2010.

[52] Pavia, D. L. et al. *Introdução à Espectroscopia - Tradução da 5a edição norte-americana,* Edição, 2º, cengage Learning, São Paulo, 2015.

[53] Smith, E. et al. *Modern Raman Spectroscopy: A Practical Approach,* Wiley, England, 2005.

- [54] Skoog, D.A. et al. *Princípios de análise instrumental*, 6 ed, cengage Learning, Austrália, 2008.
- [55] Gomes, D. S. B. Efeito da fotoexcitação na síntese de nanocompósitos biocompatíveis de ouro/pluronic. Tese de Doutorado, 2018, Universidade de Brasília.
- [56] T. Sakai, P. A. Single-step synthesis and stabilization of metal nanoparticles in aqueous pluronic block copolymer solutions at ambient temperature, *Langmuir*. 20 (2004) 8426–8430. doi:10.1021/la049514s.
- [57] T. Sakai, P. A. Spontaneous Formation of Gold Nanoparticles in Poly(ethylene oxide) - Poly(propylene oxide) Solutions: Solvent Quality and Polymer Structure Effects, *Langmuir*. 170 (2005) 8019–8025. <http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/la050756h>.
- [58] T. Sakai, P. Alexandridis, Size- and shape-controlled synthesis of colloidal gold through autoreduction of the auric cation by poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide) block copolymers in aqueous solutions at ambient conditions., *Nanotechnology*. 16 (2005) S344-53. doi:10.1088/0957-4484/16/7/006.
- [59] FTIR Spectroscopic Investigation of Effects of Temperature and Concentration on PEO-PPO-PEO Block Copolymer Properties in Aqueous Solutions. Yan-lei Su et al. *Macromolecules*. 2002.
- [60] Cordeiro, M. R. Estudo das etapas sintéticas de complexos mistos de ftalocianinas de zinco e cobalto com tetrafenilporfirina de zinco. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de São Carlos, 2004-09-13).
- [61] Muehlmann, L. A. Cloreto de alumínio-ftalocianina associado a nanopartículas de poli(vinil,metil-éter-co-anidrido maleico) como potencial fotossensibilizante de terceira geração para terapia fotodinâmica antineoplásica. Tese de Doutorado, Universidade de Brasília, 2011.
- [62] Veloso, A. B. Uso da técnica SERS na caracterização de nanoemulsão a base de AlCIPc e de células de câncer de mama tratadas por TFD: um estudo in vitro. Tese de doutorado, Universidade de Brasília, 2015.
- [63] Chithrani, B.D. et al. Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-

coated gold nanoparticles of different sizes and shapes. *Nano Lett.* (2007), 7(6):1542-50.

[64] Priyanka, S. et al. Gold Nanoparticles in Diagnostics and Therapeutics for Human Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19(7), 1979; <https://doi.org/10.3390/ijms19071979>.

[65] Damasceno, D. C. et al. Anomalias congênitas: estudos experimentais. Belo Horizonte: Coopmed, v. 102, 2008.

[66] Daltin, D. Tensoativos: Química, propriedades e aplicações, 1º ed, Edgard. Blucher, São Paulo-SP, 2012.

[67] Gong, N. et al. Nanomaterials for T-cell cancer immunotherapy. *Nature Nanotechnology Focus Review Article*, Vol 16, 2021, 25–36. <https://doi.org/10.1038/s41565-020-00822-y>.

[68] Li, Y. et al. Plasmon-Enhanced Organic And Perovskite Solar Cells With Metal Nanoparticles. *Journal Nanophotonics*, <https://doi.org/10.1515/Nanoph-2020-0099>

[69] Louis, C. et al. Gold Nanoparticles for Physics, Chemistry and Biology, Imperial C, Université Pierre et Marie Curie, France, 2012.

[70] Kotlyar, S. A. et al. (18-Crown-6)Potassium Chlorochromate Metal-Organic Compounds, *Acta Cryst.* (2005). E61, M293-M295. <https://doi.org/10.1107/S1600536805000085>

[71] Lin, W. O. et al. Agentes Complexantes: Podante, Coronante E Criptante Classificação E Nomenclatura. *Química Nova*, 21(5) (1998), Pag. 630 – 634.

[72] Mergen, V. M. D. et al. Extracellular Volume Quantification With Cardiac Late Enhancement Scanning Using Dual-Source Photon-Counting Detector CT. *Investigative Radiology* 57(6):p 406-411, June 2022. DOI: 10.1097/RLI.0000000000000851.

[73] Biasi, R. S. et al. Anisotropy field of small magnetic particles as measured by resonance. *Journal of Applied Physics* 49, 2466–2469 (1978) <https://doi.org/10.1063/1.325093>.

[74] Alves, K. M. B. et al. A Mössbauer Resonance study of Brazilian Childrenite. *Revista Ensino de Física*, v.3, n. 1. mar. 1981.

[75] Zubov, V. I. Surface Properties Of Solids And Size Effects In Nanoparticles. *Nanostructured Materials*, V. 3, P. 189-193, 1993.

## Article

# UV-Accelerated Synthesis of Gold Nanoparticle–Pluronic Nanocomposites for X-ray Computed Tomography Contrast Enhancement

Deizilene S. B. Gomes<sup>1,2</sup>, Leonardo G. Paterno<sup>3</sup>, Aline B. S. Santos<sup>1</sup>, Debora P. P. Barbosa<sup>1</sup>, Beatriz M. Holtz<sup>4</sup>, Maysa R. Souza<sup>4</sup>, Rafaianne Q. Moraes-Souza<sup>4</sup>, Aisel V. Garay<sup>5</sup>, Laise R. de Andrade<sup>6</sup>, Patricia P. C. Sartoratto<sup>7</sup>, Damien Mertz<sup>8</sup>, Gustavo T. Volpato<sup>4</sup>, Sonia M. Freitas<sup>5</sup> and Maria A. G. Soler<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Universidade de Brasilia, Instituto de Física, Laboratório de Nanofilmes e Nano Dispositivos, Brasilia-DF 70910-900, Brazil

<sup>2</sup> Instituto Federal de Educação, Ciencia e Tecnologia de Rondonia, Ji-Parana-RO 76900-730, Brazil

<sup>3</sup> Universidade de Brasilia, Instituto de Química, Laboratorio de Pesquisa em Polimeros e Nanomateriais, Brasilia-DF 70910-900, Brazil

<sup>4</sup> Federal University of Mato Grosso, Institute of Biological and Health Sciences, Laboratory of System Physiology and Reproductive Toxicology, Barra do Garças-MT 78605-091, Brazil

<sup>5</sup> Universidade de Brasilia, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Celular, Laboratório de Biofísica Molecular, Brasilia-DF 70910-900, Brazil

<sup>6</sup> Universidade de Brasilia, Instituto de Ciências Biológicas, Brasilia-DF 70910-900, Brazil

<sup>7</sup> Universidade Federal de Goiás, Instituto de Química, Goiania-GO 74690-900, Brazil

<sup>8</sup> Institut de Physique et Chimie des Materiaux de Strasbourg (IPCMS), UMR-7504 CNRS-Universite de Strasbourg, 23 rue du Loess, BP 34, CEDEX 02, 67034 Strasbourg, France

\* Correspondence: soler@unb.br

**Abstract:** Eco-friendly chemical methods using FDA-approved Pluronic F127 (PLU) block copolymer have garnered much attention for simultaneously forming and stabilizing Au nanoparticles (AuNPs). Given the remarkable properties of AuNPs for usage in various fields, especially in biomedicine, we performed a systematic study to synthesize AuNP-PLU nanocomposites under optimized conditions using UV irradiation for accelerating the reaction. The use of UV irradiation at 254 nm resulted in several advantages over the control method conducted under ambient light (control). The AuNP-PLU-UV nanocomposite was produced six times faster, lasting 10 min, and exhibited lower size dispersion than the control. A set of experimental techniques was applied to determine the structure and morphology of the produced nanocomposites as affected by the UV irradiation. The MTT assay was conducted to estimate IC50 values of AuNP-PLU-UV in NIH 3T3 mouse embryonic fibroblasts, and the results suggest that the sample is more compatible with cells than control samples. Afterward, in vivo maternal and fetal toxicity assays were performed in rats to evaluate the effect of AuNP-PLU-UV formulation during pregnancy. Under the tested conditions, the treatment was found to be safe for the mother and fetus. As a proof of concept or application, the synthesized Au:PLU were tested as contrast agents with an X-ray computed tomography scan (X-ray CT).

**Keywords:** gold nanoparticle; Pluronic F127; nanocomposites; UV accelerated synthesis; X-ray computed tomography; cytotoxicity; maternal and fetal toxicity assays



**Citation:** Gomes, D.S.B.; Paterno, L.G.; Santos, A.B.S.; Barbosa, D.P.P.; Holtz, B.M.; Souza, M.R.; Moraes-Souza, R.Q.; Garay, A.V.; de Andrade, L.R.; Sartoratto, P.P.C.; et al. UV-Accelerated Synthesis of Gold Nanoparticle–Pluronic Nanocomposites for X-ray Computed Tomography Contrast Enhancement. *Polymers* **2023**, *15*, 2163. <https://doi.org/10.3390/polym15092163>

Academic Editor: Marinos Pitsikalis

Received: 1 March 2023

Revised: 1 April 2023

Accepted: 5 April 2023

Published: 1 May 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Gold nanoparticles (AuNPs) display unique physicochemical properties, mainly related to the localized surface plasmon resonance (LSPR) phenomenon and following applications [1,2]. For multiple purposes, they are engineered into highly stable colloidal suspensions, and using different surface functionalization procedures, they show biocompatibility and colloidal stability in physiological conditions and in vivo assays [3,4]. Consequently, this nanomaterial has recently found meaningful applications in cell imaging and therapeutic processes in addition to different types of optoelectronic devices such as biosensors,

solar cells, and surface-enhanced Raman spectroscopy, as well as in photocatalysis [5–12]. In the biomedical field, AuNPs have been used in electrochemical dopamine sensors [13] and intensified in early diagnosis of Parkinson's disease [14]. New approaches to the fabrication of sensing platforms have been proposed, for instance, combining plasmonically active waveguides with microfluidics [15] or using single plasmonic nanoparticles as ultrasensitive sensors [16]. Concerning therapeutic uses, studies suggested AuNP systems for the controlled delivery of anticancer agents, resulting in enhanced antitumor activity with negligible toxicity to major organs [17]. Despite this, there is a need to thoroughly investigate the potential toxicological effects of AuNPs during pregnancy, particularly given their ability to cross the placental barrier and enter fetal circulation [18,19]. Studies have suggested that the size, shape, surface charge, and surface coating of gold nanoparticles can impact their toxicity, and it is likely that the same factors will influence their potential effects during pregnancy [19]. In addition, the route of administration may also be an important consideration, as the risks associated with intravenous administration may differ from those associated with topical or oral administration. Thereby, it is necessary to know all their possible toxicological effects [20] in order to harness all the advantages offered by this nanomaterial when delivering therapeutic formulations.

Regarding the light–matter interaction, the LSPR phenomenon in metal nanoparticles (NPs) is based on the resonance condition achieved between the frequencies for the collective oscillation of conduction band electrons in the NPs and the incident electromagnetic radiation. In the resonance condition, the wavelength of incident light is about ten times greater than the size of the NPs when the maximum LSPR extinction is reached. The resulting and very active LSPR band leads to unique scattering and absorption spectra for the NPs. In terms of NP structure, the resonance frequency depends on their size, shape, aggregation extent, surface chemistry, dielectric properties of the surrounding medium, and the level of interparticle interactions.

Among synthetic/engineering methods for producing AuNP with tailored characteristics, chemical methods have been dominant so far, enabling the production of nanostructures in sizeable amounts [21–23]. In addition, new approaches have been developed such as the novel high-throughput (HTP) synthetic platform for AuNPs, consisting of an HTP centrifugal microfluidic device and a portable automatic workstation. [24], sodium glutamate and sodium dodecyl sulfate as reducing and stabilizing agents [25], using the block copolymer template approach [26], and continuous in-flight synthesis [27]. Eco-friendly approaches have also been explored, for example, using natural extracts [28], biocompatible polymers [29], or light of different wavelengths [30] as reducing agents.

A particular type of chemical synthesis, which is the subject of the present contribution, is that performed at room temperature by simply mixing aqueous chloroauric acid ( $\text{HAuCl}_4$ ) and FDA (Food and Drug Administration)-approved block copolymers displaying a triblock PEO–PPO–PEO structure PEO: poly(ethylene oxide); PPO: poly(propylene oxide). Commercially available under the name Pluronic, one of its several grades, F-127 was used in this study. These copolymers are water soluble and work simultaneously as reducing and stabilizer agents [29]. The main advantage of such a method is that colloidal stabilization is achieved simultaneously with NP formation and no other reducing agent is required. The dynamics of the redox reactions and the size and size distribution of the produced AuNPs are influenced by the Au:copolymer stoichiometry and the copolymer molecular weight/architecture. Indeed, these variables can be adjusted to produce AuNPs with controlled size and distribution. Isothermal calorimetry titration performed in a subsequent study revealed that during the formation of F127: Au nanocomposites, at a very low F127: Au molar ratio (below 0.05), the association between tetrachloroaurate anion ( $\text{AuCl}_4^-$ ) and F127 is the prevailing event (exothermic process). However, at a larger F127: Au (0.05 to 0.12), particle growth becomes dominant when the  $\text{Au}^0$  nuclei and poly(propylene oxide) block interact by entropic hydrophobic forces [31]. In parallel, cyclic voltammetry indicated that complete reduction of  $\text{Au}^{3+}$  occurs only above the critical micellar concentration (cmc)

(~0.2–0.8 wt%) of F127 [31]. Another study suggested that the size and polydispersity of these AuNPs depend almost exclusively on the copolymer concentration [32].

A recent detailed study on the formation of AuNPs as a result of the reduction of chloroauric acid with Pluronic block copolymers [33] demonstrated that in the course of this reaction, the copolymer chains undergo oxidation, although the oxidation of the polymer does not go all the way down to carboxylic acids. Analysis of the soluble products suggested that the copolymer undergoes partial degradation, preferentially at the PPO sites, with cleavage of the C–O bonds. Although the purified AuNPs contained organic components (13%, *m/m*), no PPO groups were observed in them, suggesting that PPO chains or intact Pluronic molecules are not adsorbed on the particle surface. Interestingly, the analysis of soluble products revealed the presence of the CH<sub>3</sub> group of PPO. The product analysis also indicated the presence of newly formed OH groups both in the purified AuNPs and in the soluble products. The reaction involves the formation of free radicals and hydroperoxides, which depends on the oxygen concentration. The purified nanoparticles contain organic components but can be fully separated from the excess of the copolymer. Various reaction parameters such as pH, temperature, sodium chloride addition, and the concentration of the reactants affect the rate of the reaction and the yield and morphology of the resulting AuNPs [33]. A further step to optimize this synthesis process would be the implementation of UV irradiation to accelerate the synthesis and to control shape and physicochemical properties of the produced NPs [34–38]. The UV irradiation generates a photoexcited species ([AuCl<sub>4</sub>]<sup>−\*</sup>) that undergoes successive disproportionation and reduction reactions leading to the formation of metallic gold atoms and the initial formation of gold nanoparticles [37]. This reduction process is faster than that promoted by the block copolymer alone, which mainly functions as a template for the formation of the nanoparticles. As a result of these different reaction dynamics, better control of the size distribution of the nanoparticles can be achieved.

Aiming at optimizing this eco-friendly, one-step synthesis method, by simply mixing aqueous chloroauric acid (HAuCl<sub>4</sub>) and PLU, here we report a systematic study involving the synthesis of Au:PLU nanocomposites assisted with UV irradiation. We found that the most important benefits of using UV irradiation 254 nm/16 W were that an Au:PLU nanocomposite of a specific formulation is produced about six times faster and with lower size dispersion than that made under ambient light. Those are great advantages since they offer a more cost-effective way to fabricate AuNPs with tailored properties to enable their use in different fields, especially in the biomedical field. A set of experimental techniques (UV-vis, Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopies, thermogravimetry (TGA), transmission electron microscopy (TEM), measurement of the sedimentation coefficient using analytical ultracentrifugation (SV-AUC), and cyclic voltammetry) was performed to determine the structure and morphology of the nanocomposites as affected by UV irradiation. Then, the biological properties of the Au:PLU nanocomposites were assessed using *in vitro* cytotoxicity and *in vivo* maternal and fetal toxicity assays in rats. As a proof of concept or application, the Au:PLU synthesized in the absence/presence of UV irradiation were tested as contrast agents in an X-ray computed tomography scan (X-ray CT).

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Materials

Pluronic block copolymer F-127 (PLU, MW 12,600 g/mol), chloroauric acid trihydrate (HAuCl<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O) 99%, and dimethyl sulfoxide (DMSO) were purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). Analytical grade HCl 36%, HNO<sub>3</sub> 65%, and KCl 99% were purchased from Vetec, Duque de Caxias-RJ, Brazil. All chemicals were used as received. All experimental procedures, including solution preparations and glassware cleaning, were performed with ultra-pure water (resistivity: 18 MΩ/cm) supplied by a Millipore Milli-Q water purification system. UV-assisted synthesis of AuNP-PLU nanocomposites was carried out in borosilicate beakers (5 mL), previously cleaned with aqua regia solution (HCl/HNO<sub>3</sub>, 3:1, *v/v*) and rinsed properly with ultrapure water.



## 2.2. UV-Assisted Synthesis of AuNP-PLU Colloidal Nanocomposites

Precursor aqueous solutions of  $\text{HAuCl}_4$  and PLU were prepared at room temperature with magnetic stirring. Colloidal AuNP-PLU were synthesized following the standard protocol as reported in [31] using gentle hand mixing of PLU and  $\text{HAuCl}_4$  aqueous solutions at proper compositions (10:1 *v/v*) and then leaving them to rest. Additionally, part of the reaction mixture was submitted to UV irradiation (254 nm, 16 W, 25 °C) inside a lab-made chamber as reported elsewhere [37]. Two sets of AuNP-PLU samples were prepared, with either fixed or varied concentrations of  $\text{HAuCl}_4$  and PLU, as described in Table 1. In group 1, samples were prepared with a fixed 2 mmol L<sup>-1</sup>  $\text{HAuCl}_4$  concentration and PLU concentrations (X) varied between 0.1 and 10 mmol L<sup>-1</sup>. Samples labeled “UV” denote the reaction performed under UV 254 nm irradiation. This range of PLU concentrations comprises values below and above its critical micellar concentration (CMC), which is 0.6 mmol L<sup>-1</sup> [39]. In group 2, the PLU concentration was kept fixed at 2.0 mmol L<sup>-1</sup> to ensure the micellar structure, whereas the  $\text{HAuCl}_4$  concentration (Y) was varied between 1.0 and 4.0 mmol L<sup>-1</sup>, resulting in samples labeled YUV:AuNP-PLU. Control samples were prepared in the same way but under ambient light. The UV-assisted syntheses were carried out for different periods of time, up to 50 min, while the control sample was carried out for up to 300 min. Nonetheless, the reaction reached completion at about 10 min for most of the AuNP-PLU compositions, when it could be detected a color change in the reaction mixture from yellow to pink (Figure 1A). The UV-vis spectra precursors and control samples can be found in Supplementary Figure S1. After syntheses, the samples were transferred to common Eppendorf tubes (2 mL) and centrifuged (Mikro 22R, HETTICH Zentrifugen, Tuttlingen, Germany) at 12,000 rpm for 120 min at 10 °C to remove the excess PLU. In order to conduct Raman characterization and thermogravimetric analysis (TGA), solid samples of AuNP-PLU were obtained using extensive centrifugation and lyophilization as previously described [31] The obtained powder sample was labeled s-AuNP-PLU:XUV.

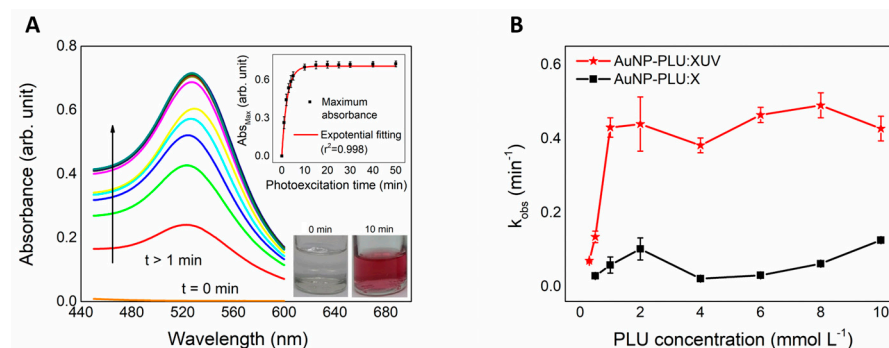
**Table 1.** Labeling of samples resulting from mixtures of aqueous solutions of precursors.

Samples	Concentration (mmol L <sup>-1</sup> )	
	PLU (X)	$\text{HAuCl}_4$ (Y)
AuNP-PLU:0.1UV	0.1	
AuNP-PLU:0.3UV	0.3	
AuNP-PLU:0.5UV	0.5	
AuNP-PLU:1.0UV	1.0	
AuNP-PLU:2.0UV	2.0	2.0
AuNP-PLU:4.0UV	4.0	
AuNP-PLU:6.0UV	6.0	
AuNP-PLU:8.0UV	8.0	
AuNP-PLU:10.0UV	10.0	
1.0UV:AuNP-PLU		1.0
3.0UV:AuNP-PLU	2.0	3.0
4.0UV:AuNP-PLU		4.0

## 2.3. Structural and Morphological Characterizations

Ambient light and UV-assisted syntheses were continuously monitored, *ex situ*, using UV-vis spectroscopy in the range of 185–900 nm, at 0.1 nm resolution, and a scan rate of 600 nm/min (0.1 s integration by 1 nm) the spectrophotometer (Shimadzu UV 2600, Shimadzu Europe, Duisburg, Germany) and quartz cuvette of 1.0 cm optical path. UV-vis spectra were recorded at different time intervals until the absorbance of the LSPR band reached a plateau. FTIR spectra were registered using the attenuated total reflectance (ATR) method (Novortex 70, Bruker Corporation, Billerica, MA, USA), with a spectral resolution of 4 cm<sup>-1</sup> and 1 scan/min for 27 min. An aliquot of 10 µL of the colloidal suspensions AuNP-PLU:2.0UV, AuNP-PLU:2.0 (used as control), or plain PLU solution was dropped

onto the ATR crystal and left to dry. Afterward, successive spectra were recorded, monitoring the water's hydroxyl stretching band ( $\nu$  O–H), in order to confirm the sample was dried before registering representative spectra of samples.



**Figure 1.** (A) UV-vis spectra obtained from monitoring the AuNP-PLU:2.0UV formation from the precursor mixture (HAuCl<sub>4</sub> + PLU) at  $t = 0$  and after 10 min. The formation of the AuNP-PLU:2.0UV nanocomposite is observed after 10 min. The lower and upper insets show digital snapshots of the reaction mixture at  $t = 0$  min and  $t = 10$  min and changes in the maximum absorption for AuNP-PLU:2.0UV of the plasmonic band during the photoexcitation time, respectively. (B) The observed rate constant of AuNP-PLU:2.0UV and AuNP-PLU:2.0 by the PLU concentration used in the synthesis process, as indicated.

Thermogravimetric analysis (TGA) curves were registered with a DTG60H (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) system from 25 to 600 °C with a heating rate of 10 °C/min in a N<sub>2</sub> atmosphere with a flux rate of 30 mL/min in an aluminum sample holder. This equipment provides measurements with an uncertainty of 0.5%/weight.

The morphology of the AuNP-PLU samples was observed using transmission electron microscopy (TEM) carried out with a JEOL 2100 microscope. The mean diameter (D<sub>TEM</sub>) and polydispersity index ( $\sigma$ ) were determined from size histograms fitted with a log-normal distribution function. The diameters of approximately 1000 particles, measured with the aid of the Image J software in different TEM images, were used to build the histograms. In addition, the hydrodynamic diameter and zeta potential of colloidal samples were determined using dynamic light scattering and electrophoresis mobility, respectively, measured with a Zetasizer Nano ZS Malvern Instruments, UK. The analyses were performed at a scattering angle of 173° at 25 °C using a 4 mW He-Ne laser operating at 632.8 nm.

Cyclic voltammetry (CV) was used to estimate the amount of Au<sup>3+</sup> ions that were not reduced during synthesis and thus qualitatively evaluate the efficiency of chemical/photochemical reduction. Voltammograms were recorded with a Metrohm potentiostat/galvanostat model Autolab PGSTAT 204 in a three-electrode configuration cell (Ag/AgCl reference electrode with saturated KCl, Pt wire as the counter electrode, and an indium-doped tin oxide (ITO) slide—0.60 cm<sup>2</sup> active area—as the working electrode). The electrochemical cell was filled with the HAuCl<sub>4</sub>-PLU mixtures or AuNP-PLU samples containing KCl (0.1 mol L<sup>-1</sup>) as the supporting electrolyte. Experiments were carried out at 25 °C at 50 mV/s after purging the electrochemical cell with N<sub>2</sub> for 5 min.

The particles produced using UV irradiation (AuNP-PLU:2.0UV) and using ambient light (AuNP-PLU:2.0) were investigated with sedimentation velocity analytical ultracentrifugation (SV-AUC) using a Proteome-Lab XL-A analytical ultracentrifuge equipped with a 4-hole titanium An-60 Ti rotor, cells with 12 mm path length, a double channel centerpiece, and quartz windows (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). The assay was carried out at 2500 rpm at 20 °C in a vacuum system. Absorbance was measured at two wavelengths (260 and 530 nm) at scanning intervals for each sample reading of 2 min with 0.007 cm radial resolution. PLU absorbs at 260 nm, whereas AuNP-PLU absorbs at 530 nm. The collected radial scans were analyzed using the size distribution analysis ls-g(s) model with the SEDFIT v14.7 software using a resolution of 400, a sedimentation coefficient analysis

interval of 0–10,000, and a confidence level of 0.951. The  $c(s)$  was calculated using the appropriate correction for the viscosity and density of water at 20 °C ( $S_{20,w}$ ) with the SEDFIT software.

#### 2.4. Cell Viability Test

##### 2.4.1. Cell Culture

NIH-3T3 mouse embryonic fibroblast cells (ATCC<sup>®</sup> CRL-1658TM) were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco<sup>®</sup> Life Technologies, Ltd., Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10% (*v/v*) fetal bovine serum (Gibco<sup>®</sup> Invitrogen<sup>™</sup>, Waltham, MA, USA) and antibiotics (100 IU mL<sup>-1</sup> penicillin and 100 µg mL<sup>-1</sup> streptomycin-Sigma-Aldrich) at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> incubator.

##### 2.4.2. In Vitro Cytotoxicity Assay

The NIH-3T3 cells were seeded at a density of  $5 \times 10^3$  cells per well in 96-well plates. After 24 h of incubation, 200 µL of the culture medium containing AuNP-PLU:2.0UV (0.22 to 3.4 µM AuNP; 0.03–0.41 mM PLU) were added to the wells for 15 min or 24 h. Following 15 min exposure, cells were rinsed twice with phosphate buffer saline (PBS pH 7.4), and then the culture conditions were reestablished for 24 h. The potential cytotoxic effect was determined using a (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Waltham, MA, USA) assay. Cells were incubated with MTT solution (5 mg mL<sup>-1</sup>) for 2 h, and the colorimetric product, formazan crystals, was solubilized in DMSO. The absorbance values were measured with a spectrophotometer (Molecular Devices SpectraMax M2<sup>®</sup>, Silicon Valley, CA, USA) at 595 nm. The raw data were normalized to the control data (cells treated with culture medium containing PBS, PBS replaced AuNP-PLU:2.0UV). The IC<sub>50</sub> value (half-maximal inhibitory concentration) was calculated using a nonlinear regression dose–response analysis with AuNP concentration in logarithm. Results were expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD) of triplicate determinations from three independent experiments ( $n = 9$ /concentration). The AuNP-PLU:2.0 (0.05 to 0.86 µM AuNP; 0.03–0.48 mM PLU) and PLU solutions were tested under the same conditions for comparison purposes.

##### 2.5. In Vivo Maternal and Fetal Toxicity of AuNP-PLU:2.0UV in Rats

Adult female (180–200 g) and male (220–240 g) Wistar rats were maintained in cages for three rats with autoclaved wood chips under standard laboratory conditions (23  $\pm$  2 °C, humidity 50  $\pm$  10%, 12 h light/dark cycle), with pelleted food and tap water provided ad libitum. The local Experimental Ethical Committee for Animal Research approved procedures and animal handling protocols used in this study (Protocol Number: 23108.022668/2019-23).

After two weeks of acclimation in the vivarium of the Laboratory of System Physiology and Reproductive Toxicology, Federal University of Mato Grosso (UFMT), all female rats were mated overnight with male rats. Gestational day zero (D0) was recorded and assigned the following morning when spermatozoa were found in the vagina smear [40]. The pregnant rats were randomly distributed using computer random numbers into two experimental groups ( $n = 12$  animals/group): Control = pregnant rats treated with water and Treated = pregnant rats treated with AuNP-PLU:2.0UV. The rats were treated with AuNP-PLU:2.0UV or vehicle (water) in the morning with the intragastric route (gavage) during pregnancy (from gestational day 0 to 21). The dosage selection of AuNP-PLU (137.5 µg/kg) was made according to the previously reported dose [4], which in humans is equivalent to 22 µg/kg based on the body surface area (BSA) [41].

On days 0, 7, 14, and 21 of pregnancy (at 9 a.m.), the maternal body weights, food, and water consumption were determined. On day 21 of pregnancy, the rats were anesthetized using sodium pentobarbital (Thiopentax<sup>®</sup>-120 mg/kg). Then, they were submitted to laparotomy for exposure to uterine horns. The gravid uterus was, withdrawn, weighed, and dissected. The percentage of embryonic loss before and after implantation was cal-

culated [42]. Fetuses and placentas were weighed. Fetuses were then classified by body weight [43] and evaluated to determine the presence of external anomalies. After external analysis, half of the fetuses were fixed in Bouin's fluid, and serial sections were prepared as described by Wilson [44] for visceral examination. The remaining fetuses were prepared for an examination of skeletons using the staining procedure of Staples and Schnell [45]. In addition to the skeletal analyses, counting of ossification sites was performed to determine the degree of fetal development [46,47].

The Student's t-test was performed to evaluate mean values, whereas the Fisher Exact test was conducted to compare percentages.  $p < 0.05$  was applied and considered as the limit of statistical significance.

## 2.6. X-ray Computed Tomography Scan

CT images were performed at the Laboratório de Caracterização Tecnológica, Escola Politécnica, Universidade de São Paulo-SP, Brazil. Liquid samples containing the synthesized nanocomposites were stored in Eppendorf and analyzed in batches containing 6 samples using the 3D X-ray microscope: Zeiss Xradia Versa XRM-510 equipment, for beam energies of 80, 100, 120, and 140 KV. The attenuation coefficients of air and deionized water were used for calibration. The AuNP-PLU:2.0UV with Au of 1.23 mg/mL sample was compared with Optiray@320\_1 (Liebel-Flarsheim Company LLC, Raleigh, NC, USA (EUA) containing I at the same concentration ( $I = 1.23$  mg/mL) and AuNP-PLU: 2.0 containing a Au concentration of 1.09 mg/mL was compared with Optiray@320\_2 with I at the same concentration ( $I = 1.09$  mg/mL).

## 3. Results and Discussion

### 3.1. Effect of the UV Light on the Features of Synthesized AuNP-PLU

#### 3.1.1. Kinetics of UV-Assisted Synthesis of AuNP-PLU

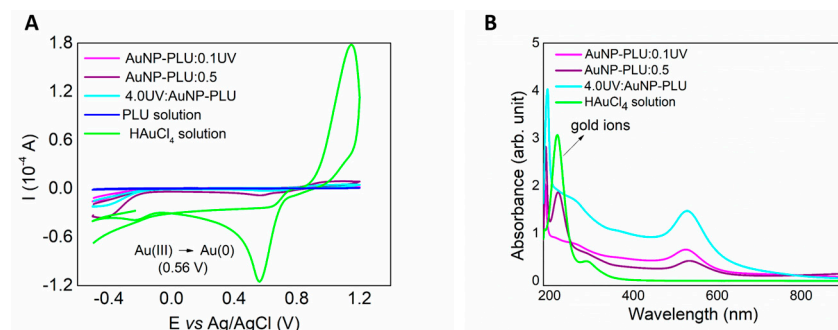
The formation of the AuNP-PLU NC under UV light was monitored using UV-vis spectroscopy with the evolution of the typical LSPR band of AuNPs. An overview of the formation of AuNP-PLU:2.0UV, chosen as the reference sample, is provided in Figure 1. In Figure 1A, the UV-vis spectra recorded at different time intervals display the LSPR band typical of AuNPs from the very beginning of the reaction. The LSPR band is centered at 526 nm for  $t = 10$  min. The inset in Figure 1A shows digital snapshots of the reaction mixture at  $t = 0$  min and  $t = 10$  min. After 10 min of reaction, the typical pink color of AuNPs is clearly seen. Otherwise, for the reaction carried out under ambient light, the formation of AuNPs is visually detected solely after 60 min (as observed in ref. [32], where the LSPR band is centered at 536 nm), thus indicating that UV irradiation accelerates the reaction and the LSPR band of AuNP-PLU:2.0UV is blue-shifted in comparison to the sample AuNP-PLU:2.0. Indeed, Supplementary Figure S2 displays isotherms for the formation of AuNP-PLU under ambient light (AuNP-PLU:2.0) (data from ref. [32]) and UV irradiation (AuNP-PLU:2.0UV). Although both isotherms show an asymptotic behavior, it is noted that the reaction is much faster in the presence of UV irradiation, which reaches equilibrium in about 10 min, in contrast to the reaction carried out under ambient light, which reaches equilibrium in about 60 min. Experimental data were further fitted with a first-order kinetics model as expressed by Equation (1):

$$Abs_{max} = Abs_{\infty} \left( 1 - \exp^{-k_{obs}t} \right) \quad (1)$$

In Equation (1),  $Abs_{max}$  is the maximum LSPR absorbance (in arbitrary units) in the reaction time  $t$  (expressed in min),  $Abs_{\infty}$  is the absorbance of the LSPR band at an infinite time of reaction (in arbitrary units),  $k_{obs}$  is the observed rate constant (in  $\text{min}^{-1}$ ), and  $t$  is the reaction time (in min). As shown in Figure 1B,  $k_{obs}$  becomes independent of the PLU concentration as the cmc condition is reached for both reaction conditions (ambient light and UV irradiated). Nonetheless,  $k_{obs}$  is about four times larger under UV irradiation.

### 3.1.2. Evaluation of the Yield of AuNP-PLU-UV Production

Cyclic voltammetry (CV) was used to further investigate the effect of the UV irradiation by measuring the amount  $\text{Au}^{3+}$  ions left over during reduction by PLU. This experiment was conducted with the sample AuNP-PLU:0.1UV, which was produced with the lowest PLU concentration, as well as with the sample 4.0UV:AuNP-PLU, which was produced with the largest  $\text{HAuCl}_4$  concentration. In addition, the experiment also used the sample AuNP-PLU:0.5, which was prepared under ambient light with the smallest PLU concentration, but sufficient to produce sizeable amounts of AuNPs. As shown in Figure 2A, the voltammogram (green curve) of the plain  $\text{HAuCl}_4$  solution clearly shows the  $\text{Au}^0/\text{Au}^{3+}$  redox pair at +1.0 V and +0.56 V, respectively, plus the cathodic wave for  $\text{Au}^{1+}/\text{Au}^0$  at  $-0.2$  V. The voltammogram of plain PLU shows a subtle anodic event at +0.11 V. Indeed, this is sufficient to reduce  $\text{Au}^{3+}$  to  $\text{Au}^0$ , which occurs at a much higher potential, as discussed in a previous contribution [32]. On the other hand, these electrochemical signals almost disappear in the voltammograms of the nanocomposites as a result of the  $\text{Au}^{3+}$  reduction. Nonetheless, the sample AuNP-PLU:0.5 still has a considerable residual amount of  $\text{Au}^{3+}$  (about 7 wt%), whereas in AuNP-PLU:0.1UV, the nanocomposite produced under UV irradiation, this amount is only 0.3 wt%, even though this sample was produced using a 5-fold lower PLU concentration. It is worth noting that the sample 4.0UV:AuNP:PLU, which was produced in a less favorable composition with an excess of  $\text{HAuCl}_4$ , presented only 1.5 wt% of unreduced gold ions. These observations are corroborated further by the UV-vis spectra of these samples, as shown in Figure 2B. In particular, the absorption of  $\text{AuCl}_4^-$  species at 220 nm is only detectable in the spectra of the plain  $\text{HAuCl}_4$  solution and AuNP:PLU:0.5, which were not submitted to UV irradiation. In summary, the implementation of UV irradiation not only accelerated the reaction performed under ambient light but also increased its yield, even at a very low PLU concentration (AuNP-PLU:0.1UV).

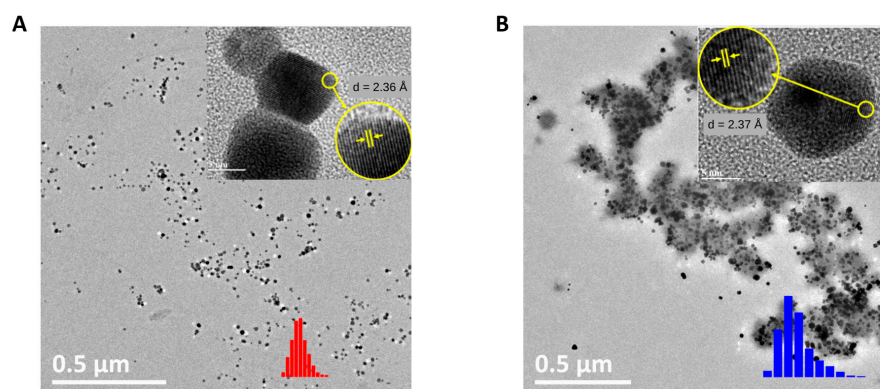


**Figure 2.** Cyclic voltammograms of the  $\text{HAuCl}_4$  solution at a concentration of  $2.0 \text{ mmol L}^{-1}$ , and the AuNP-PLU:0.1UV (lowest PLU concentration), 4.0UV:AuNP-PLU NCs, and AuNP-PLU:0.5 control sample, as indicated. (B) UV-vis spectra of the same samples displayed in (A), as indicated.

The percentual of PLU in the nanocomposites was estimated using TGA curves, shown in Supplementary Figure S3. The TGA curves of the plain PLU, AuNP-PLU:2.0UV, and AuNP-PLU:2.0 are very similar showing a single mass loss event around  $400^\circ\text{C}$ , which is regarded as the degradation of PLU. According to the derivative TGA, however, the degradation of PLU occurs slightly below this temperature in the nanocomposites as a result of the oxidation of PLU by  $\text{Au}^{3+}$ . The estimated concentration of PLU in AuNP-PLU:2.0UV and AuNP-PLU:2.0 is approximately  $20 \text{ mg/mL}$  ( $1.58 \text{ mmol L}^{-1}$ ) and  $24 \text{ mg/mL}$  ( $1.90 \text{ mmol L}^{-1}$ ), respectively. In addition, the atomic absorption analysis performed on AuNP-PLU:2.0UV and AuNP-PLU:2.0 samples gives a gold concentration of  $3.12 \text{ mmol L}^{-1}$  and  $2.77 \text{ mmol L}^{-1}$ , respectively. These results corroborate those achieved by cyclic voltammetry, which also suggested that the UV-assisted synthesis process has a higher yield than that conducted under ambient light in the same compositional conditions.

### 3.1.3. Morphology of AuNP-PLU

The morphology of the nanocomposite and the mean size of the AuNP cores were evaluated using TEM. Typical TEM micrographs of the AuNP-PLU:2.0UV and AuNP-PLU:2.0 samples are provided in Figures 3A and 3B, respectively. Both samples are composed mainly of spheric-like nanoparticles. The high-resolution micrographs shown in the inset also reveal a high crystalline appearance with regularly spaced crystallographic planes. The interplanar distance in each sample was assessed using ImageJ software as follows: 2.36 Å (AuNP:PLU:2.0) and 2.37 Å (AuNP:PLU:2.0UV). These values are comparable to that provided by the Joint Committee on Powder Diffraction Standards-crystallographic plugs for the fcc structure of gold, which corresponds to the {111} family planes.



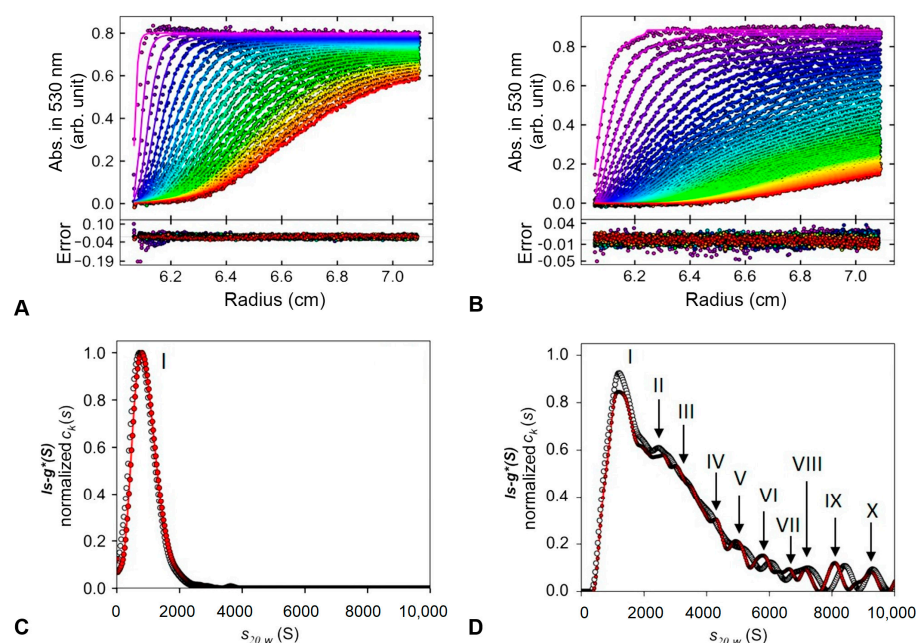
**Figure 3.** TEM micrographs of the AuNP-PLU:2.0UV sample (A) and of the AuNP-PLU:2.0 control (B) both with a scale bar of 0.5  $\mu\text{m}$  and 5 nm in the respective insets. The upper insets depict a crystalline plane {111} of gold nanoparticles; the lower insets (red and blue) show the nanoparticle diameter histograms as vertical bars, as indicated. Data of (B) were reproduced with permission [31]. Copyright 2018, Elsevier B. V.

Particle size histograms were built with sizes measured in TEM micrographs and fitted with a log-normal distribution function give the following diameter ( $D_{\text{TEM}}$ ) and standard diameter deviation ( $\sigma$ ) attained from nanoparticle diameter histogram (vertical bars) fitted with a log-normal distribution function, as displayed in Supplementary Figure S4. The results were  $12.2 \pm 0.2$  ( $\sigma = 0.2 \pm 0.02$ ) and  $18.5 \pm 0.2$  nm ( $\sigma = 0.3 \pm 0.27$ ) for AuNP-PLU:2.0UV and AuNP-PLU:2.0 [31], respectively. It is noticeable that AuNPs prepared with UV irradiation are smaller with a standard diameter deviation lower than the control AuNP-PLU:2.0. These findings show an improvement in the morphology of AuNPs produced under UV irradiation. Furthermore, a thin polymeric coating around the UV-synthesized AuNPs is seen in the TEM images (Figure 3A), while AuNPs control samples are enfolded by the polymer (Figure 3B). Although the estimated concentration of PLU in AuNP-PLU:2.0UV is only 20% less than in AuNP-PLU:2.0, it is intriguing that only a thin PLU coating was seen in the micrographs of the former. This observation may be associated with the higher yield of AuNPs when using UV light, but it could also be related to a more extensive degradation/oxidation of PLU under UV light. These findings suggest an improvement in the morphology of AuNPs produced under UV irradiation.

The concentration of AuNPs present in the NCs was estimated considering the data of the mean diameter  $D_{\text{TEM}}$  and the gold concentration obtained with atomic absorption measurements. The values found were 13.6 and 3.4  $\mu\text{mol L}^{-1}$  for the AuNP-PLU-2.0UV and AuNP-PLU:2.0 samples, respectively. Considering those values as the amount of PLU being adsorbed by AuNPs, the molar ratios given by the amount of PLU by AuNPs [PLU/AuNPs] for AuNP-PLU:2.0UV and AuNP-PLU:2.0 are 116 and 559, respectively. These results indicate that the amount of PLU by AuNP in the control sample is approximately 4-fold greater than that in AuNP-PLU:2.0UV, which agrees with the TEM micrograph shown in Figure 3B.

According to the scattered intensity distribution data obtained with DLS measurements (Supplementary Figure S5), the average hydrodynamic diameter of AuNP-PLU:2.0UV and AuNPPLU:2.0 is  $37.2 \pm 2.2$  nm and  $50.2 \pm 0.4$  nm, respectively, with a PDI of 0.2. These findings indicated that the incidence of UV irradiation not only accelerates the reaction, but it also decreases the size of the AuNP cores and the hydrodynamic size produced by nanocomposites.

The size distribution of the NCs produced with UV-assisted synthesis and the control using environment light was further analyzed using the apparent sedimentation coefficient distribution ( $ls-g^*(s)$ ) in an SV-AUC assay, as described in the experimental section. This approach is used without any knowledge of the partial specific volumes of the sedimentation species, according to those previously described. Figure 4 displays the results for AuNP-PLU:2.0UV and AuNP-PLU:2.0.



**Figure 4.** Sedimentation velocity analytical ultracentrifugation assay. Typical raw sedimentation profiles of absorbance at 530 nm versus cell radius for the particles present in the NCs are shown in (A,B). Residual plot produced using SEDFIT v14.7 software showing the fitting goodness. The lower panels show the apparent distributions of the sedimentation coefficient  $ls-g^*(S)$  at 260 nm (black) and 530 nm (red) obtained for AuNP-PLU:2.0UV (C) and control AuNP-PLU:2.0 (D). The peaks correspond to different populations of nanoparticles and are indicated with Roman numerals.

When AuNP-PLU:2.0UV (Figure 4A) is subjected to a high-field centrifuge, uniform sedimentation of the particles is observed with an exponential curve behavior that reaches a concentration plateau (abs.  $\sim 0.8$ ). The best fit of the curve in Figure 4A was attained with a mathematical model based on the Lamm, which describes the spatial and temporal behavior of the concentration considering the sedimentation by mass transport by diffusion [48]. Using the  $ls-g^*(s)$  procedure, fair RMS deviation values ( $<0.007$ ) were obtained for both data sets. In the case of  $ls-g^*(s)$  sedimentation profiles at 530 nm for photoexcited AuNP-PLU:2.0UV, a single peak (Figure 4C) with sedimentation coefficient  $S_{20,w}$  of 947.10S was observed, indicating a homogeneous population of nanoparticles (Figure 4D and Table 2).

**Table 2.** Sedimentation parameters of the nanoparticles.

Synthesis Methods	Distribution at 530 nm			Distribution at 260 nm		
	ls-g* (S) Peaks	S <sub>20,w</sub>	Percentage Ratio (%)	ls-g* (S) Peaks	S <sub>20,w</sub>	Percentage Ratio (%)
Environment light (Control)	I	1451.17	43.21	I	1418.534	44.17
	II	2613.09	13.30	II	3555.02	43.80
	III	3477.32	20.04	III	6118.22	2.71
	IV	4403.81	5.24	IV	7145.20	3.26
	V	5030.07	4.98	V	8441.53	2.02
	VI	5811.97	3.67	VI	9364.58	1.69
	VII	6343.14	0.85			
	VIII	6681.68	1.44			
	IX	7198.76	1.44			
	X	8125.44	2.16			
photoexcited synthesis (UV)	I	947.10	99.36	I	857.78	99.15

However, for AuNP-PLU:2.0, which was produced under ambient light (Figure 4B), faster sedimentation is observed, which may be associated with the presence of larger particles. Similar to our previous report [31], the ls-g\*(s) sedimentation distribution profiles at 260 nm and 530 nm for this NC showed the highest and broadest peak with smaller and less abundant ones, probably formed by heterogeneous particle populations according to the distribution analyses.

The main particle population measured at 530 nm corresponds to peak I (43.2%) with a sedimentation coefficient S<sub>20,w</sub> of 1451.17S, while the next two populations that contribute significantly are those related to peak II (13.3%) and III (20.04%) with 2613.09S and 3477.32S, respectively (Figure 4D and Table 2). Other peaks with less than 5% in the distribution analyzed are also detected, suggesting a small content of other particle sizes. A control experiment performed with plain PLU showed that the same conditions of ultracentrifugation are unable to sediment the polymer during the experimentation time. The similarity between the ls-g\*(S) distribution versus S<sub>20,w</sub> at 260 and 530 nm of the samples suggests that all particles detected are formed by complexes of gold and polymer. The absence of polymeric aggregates without gold in its structure indicates that the presence of gold or UV irradiation, by itself, does not induce spontaneous aggregation of the polymer.

The SV-AUC results are in agreement with those found using transmission electron microscopy (TEM), presented in Figure 3, where the sample synthesized with UV photoexcitation (AuNP-PLU:2.0UV) presented a narrower size distribution. Indeed, the TEM and SV-AUC characterizations show that implementation of UV irradiation improves the reaction by producing samples with a more controlled size and size distribution.

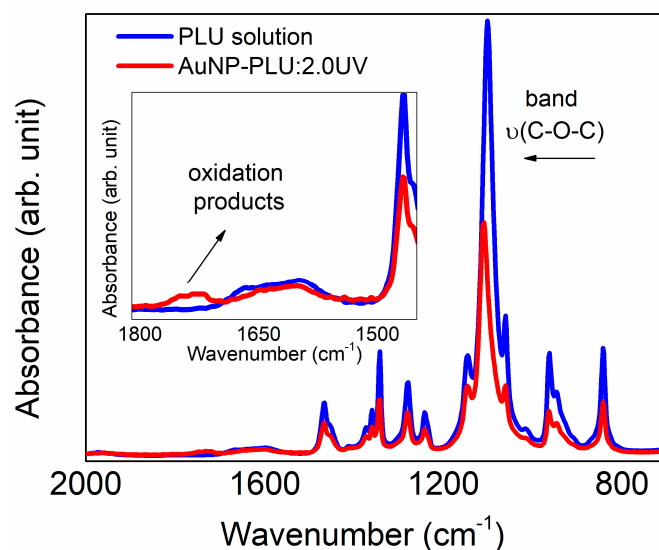
#### 3.1.4. The Role of UV Light and PLU on the Formation of AuNP-PLU

The results of the UV-vis and FTIR-ATR analyses presented in Figures 1 and 5 showed that the PLU and HAuCl<sub>4</sub> solutions do not show spectral variations when exposed to UV radiation. Thus, the formation of AuNP-PLU is surely related to the effect of irradiation in the reaction mixture (PLU + HAuCl<sub>4</sub>).

The structural features of nanocomposites were evaluated further using ATR FTIR and Raman spectroscopies. As shown in Figure 5, the ATR-FTIR spectrum of plain PLU after being submitted to UV irradiation for 10 min does not show any signs of additional oxidation or any conformational change, remaining identical to that not exposed to UV [31]. On the other hand, the spectrum of AuNP-PLU:2.0UV contains an additional broad band between 1700 and 1750 cm<sup>-1</sup>, which is ascribed to the C=O stretching in aldehydes, ketones, or carboxylic acids, thus confirming the oxidation of the polymer when irradiated in the presence of AuCl<sub>4</sub><sup>-</sup> ions. In addition, the ν(C-O-C) band is shifted to higher wavenumbers (1100 to 1110 cm<sup>-1</sup>). This shift could be related to the presence of a lower amount of PLU,



as observed in the TGA analysis of AuNP-PLU:2.0UV, or changes in PLU molecular weight due to more extensive polymer degradation and oxidation in the UV light method.



**Figure 5.** ATR FTIR spectra obtained for aqueous solutions of F127 at a concentration of  $2.0 \text{ mmol L}^{-1}$  and the AuNP-PLU:2.0UV sample after 10 min of photoexcitation. Inset: enlarged view of the region close to  $1700 \text{ cm}^{-1}$ .

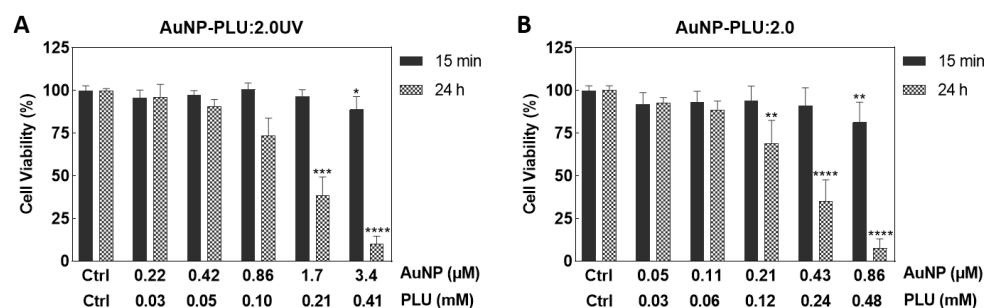
It is known that the thermal reduction of  $\text{AuCl}_4^-$  in the presence of an aqueous solution of various organic molecules creates AuNPs by the nucleation and growth processes [49]. Usually, the first step is the association of anionic  $\text{Au}^{3+}$  complexes with the organic molecules, followed by a multiple-step redox reaction that results in  $\text{Au}^0$  nuclei and oxidized organic molecules. In these cases, the size of AuNPs depends strongly on the rate of reduction of the  $\text{Au}^{3+}$  species; an increase in the rate of the redox reaction creates a large number of  $\text{Au}^0$  nuclei and decreases the number of oxidized gold species in the solution. The consequence is a more uniform growth of small AuNPs. The mechanism of AuNP formation under UV irradiation of a reaction mixture containing  $\text{HAuCl}_4$  and citric acid seems to be similar to the respective thermal mechanism, with the photoexcited citrate– $\text{AuCl}_3^-$  complex being responsible for the speeding up the formation of  $\text{Au}^0$  nuclei [49].

It is well established that when trivalent gold ions  $\text{AuCl}_4^-$  are irradiated with UV-light, the reduction occurs in successive steps: (i) reduction into the unstable bivalent state  $\text{Au}^{2+}$ ; (ii) disproportionation of  $\text{Au}^{2+}$  into  $\text{Au}^{3+}$  and  $\text{Au}^{1+}$ ; and (iii) reduction of accumulated  $\text{Au}^{1+}$  ions to  $\text{Au}^0$  [35]. It is worthwhile to note that  $\text{Au}^{1+}$  is not easily reduced as long as  $\text{Au}^{3+}$  ions are present in high amounts, and it does not disproportionate because the reduction potential  $\text{Au}^{1+}/\text{Au}^0$  is considerably negative ( $-1.4 \text{ V}$ ). Mallick et al. propose that photolysis of  $\text{H}_2\text{O}$  (UV source dependent) generates both H and OH radicals that can react with organic molecules producing strong reducing molecular radicals, which are able to reduce  $\text{Au}^{1+}$  to  $\text{Au}^0$  [36]. Thus, it can be concluded that the presence of organic radicals is very likely to accelerate the formation of  $\text{Au}^0$  nuclei. In this regard, Sokolsky-Papkov and Kabanov studied the formation of AuNPs from  $\text{HAuCl}_4$  in the presence of Pluronic F127, and they found a strong relation between the presence of oxygen reactive species (i.e., superoxide, hydroxyl radicals, hydrogen peroxide), which were formed by the decomposition of the hydroperoxides initially present in Pluronic, and the characteristics of AuNPs [34]. Simply stated, as the amount of oxygen-reactive species increases, the size and polydispersity of AuNPs reduce. Further, they concluded that Pluronic undergoes oxidation/degradation with the formation of lower molecular mass alcohols. Although this detailed study was performed without UV irradiation, it is reasonable to consider that these oxygen-reactive species play an important role in the formation of AuNPs from

HAuCl<sub>4</sub>/PLU mixtures under UV light, and it may explain a great part of our results regarding reaction time, size, morphology, yield, and polydispersity of AuNps.

### 3.2. In Vitro Cytotoxicity Assay

Figure 6 shows the effect of concentration and exposure time of AuNP-PLU:2.0UV and AuNP-PLU:2.0 on the viability of NIH-3T3 cells. In the short term (15 min), the largest concentrations of AuNP-PLU:2.0UV and AuNP-PLU:2.0 caused a slight reduction in viability compared to controls, less than 20%. However, after 24 h of incubation, AuNP-PLU:2.0UV (at 1.7  $\mu$ M) and 3.4  $\mu$ M AuNP reduced respectively, about 62 and 90% of NIH-3T3 cells viability, compared to control group. Additionally, for the same dose (0.86  $\mu$ M), AuNP-PLU:2.0UV was significantly less toxic (reduction of 26%) than AuNP-PLU:2.0 (reduction of 92%). The IC<sub>50</sub> value estimated for AuNP-PLU:2.0UV was 1.29  $\mu$ M ( $R^2 = 0.7453$ ), whereas the value for AuNP-PLU:2.0 was 0.32  $\mu$ M ( $R^2 = 0.7495$ ). Cells treated only with PLU showed viability greater than 80% (Supplementary Figure S6).



**Figure 6.** Effect of AuNP-PLU:2.0UV or AuNP-PLU:2.0 on viability of the NIH-3T3 cells determined using an MTT assay. Cells were incubated with AuNP-PLU:2.0UV (A) or AuNP-PLU:2.0 (B) for 15 min or 24 h. AuNP concentrations ranged from 0.22 to 3.4  $\mu$ M in the AuNP-PLU:2.0UV sample and 0.05 to 0.86  $\mu$ M in the AuNP-PLU:2.0 sample. Data are presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD) from three independent experiments. Differences among groups were determined using the Kruskal–Wallis test and Dunn’s multiple comparison post hoc test. Asterisks indicate significant differences compared to the respective control group: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

According to these findings, AuNP-PLU:2.0UV nanocomposites are potential candidates for use as biocompatible carriers of drug and/or contrast agents. In general, information about the toxicity of NPs, particularly in vulnerable populations such as pregnant women and their fetuses, has lagged behind the development of new applications. AuNPs can cross the placental barrier and directly damage fetal tissues and/or interfere with proper placental development and function, creating a hostile gestational environment for fetal growth and development [50]. There is evidence that 3–4 nm AuNPs cross the human placental barrier in limited amounts and accumulate in the placental, depending on their size and surface modification [51]. To support the safety-by-design concept within nanotechnology research, we seek to understand if AuNP-PLU:2.0UV impacts maternal–fetal health using a model of pregnant rats.

### 3.3. In Vivo Maternal and Fetal Toxicity in Rats

While there may not be many studies specifically evaluating the maternal toxicity or teratogenicity of AuNPs during pregnancy, there is some evidence suggesting that these particles could have harmful effects [52–54]. Therefore, the toxicological effects of AuNPs for both mother and fetus were evaluated. Table 3 shows the maternal toxicological parameters, and no differences were noted among the groups in maternal weight, gravid uterus weight, food and water consumption, relative organ weight, and biochemical parameters. In an animal laboratory, factors such as body weight and water and feed consumption, as well as organ weight, are considered important parameters in the assessment of the systemic toxicity of a substance [55]. In addition, increased AST and ALT concentrations in

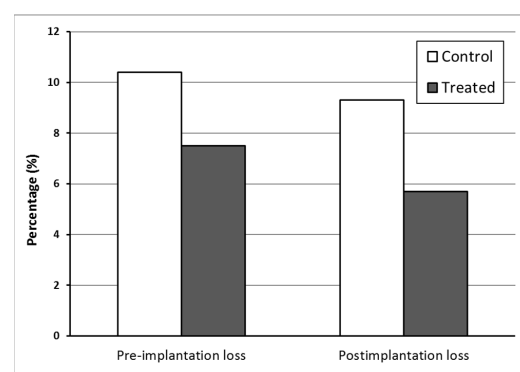
blood are used as biochemical markers of hepatic tissue damage, and urea and creatinine are used to evaluate renal function [43]. Our data showed no differences in these parameters between groups, thus suggesting that treatment performed with AuNP-PLU:UV should not impart maternal toxicity.

**Table 3.** Maternal toxicological parameters of rats treated with water (Control) or AuNP-PLU:2.0UV (Treated) during the pregnancy.

	Groups	
	Control (n = 12)	Treated (n = 12)
<b>Weight gain in pregnancy (g)</b>		
1st week	19.75 ± 5.96	20.42 ± 7.95
2nd week	22.75 ± 10.60	20.75 ± 4.90
3rd week	79.67 ± 15.76	79.67 ± 15.76
Total body weight gain—WG	121.1 ± 12.2	115.3 ± 19.0
Gravid uterus weight—GUW (g)	72.5 ± 19.3	79.4 ± 12.1
BWG minus GUW (g)	44.27 ± 14.96	38.34 ± 10.65
Daily food consumption (g)	20.32 ± 2.11	21.39 ± 2.60
Daily water intake (mL)	55.55 ± 6.96	56.48 ± 12.64
<b>Relative organ weight (g/100g)</b>		
Heart	0.31 ± 0.03	0.31 ± 0.03
Liver	3.94 ± 0.41	3.98 ± 0.31
Spleen	0.22 ± 0.06	0.20 ± 0.02
Kidneys	0.55 ± 0.04	0.55 ± 0.03
<b>Biochemical serum parameters</b>		
ALT (U/L)	41.41 ± 10.61	39.50 ± 8.79
AST (U/L)	145.82 ± 32.42	127.98 ± 42.13
Urea (mg/dL)	45.43 ± 8.69	49.80 ± 7.70
Creatinine (mg/dL)	0.62 ± 0.16	0.58 ± 0.12

Data shown as mean ± standard deviation (SD).  $p > 0.05$  compared with the Control group (Student's *t*-test).

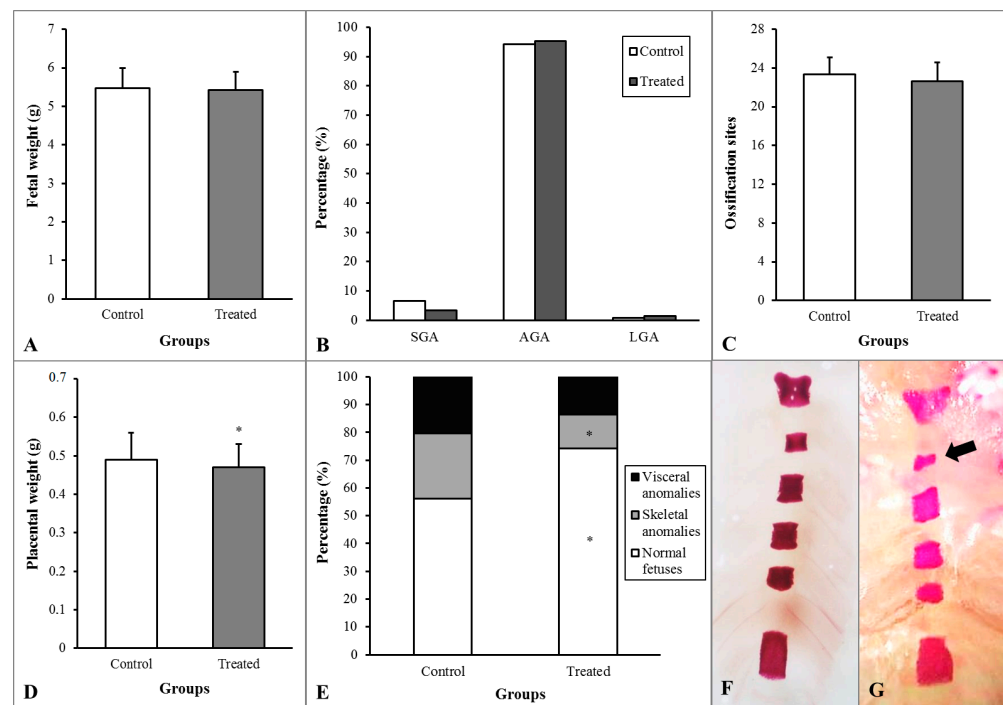
For the success of pregnancy, it is essential that, during the implantation period, the physiological and molecular processes are coordinated, involving close interactions between the uterus and the blastocyst [56]. The pre- and post-implantation loss rates did not differ statistically among the groups (Figure 7).



**Figure 7.** Percentage of losses of embryos before and after implantation at the term of pregnancy (DP21) for rats treated with water (Control) or AuNP (Treated) during pregnancy.  $p > 0.05$  compared with the Control group (Fisher's Exact test).

During pregnancy, exposure to toxic agents may lead to different effects ranging from functional or morphological changes, developmental delay, and anomalies to lethality in fetuses [57]. Figure 8 shows fetal and placental development. The rats that received AuNP presented a decrease in placenta weight and skeletal anomalies rate and an increase in normal (without anomalies) fetuses rate. Although the AuNP-PLU:UV treatment de-

creased placental weight, this modification did not affect fetal development, which showed unchanged fetal weight, weight classification, and ossification sites.

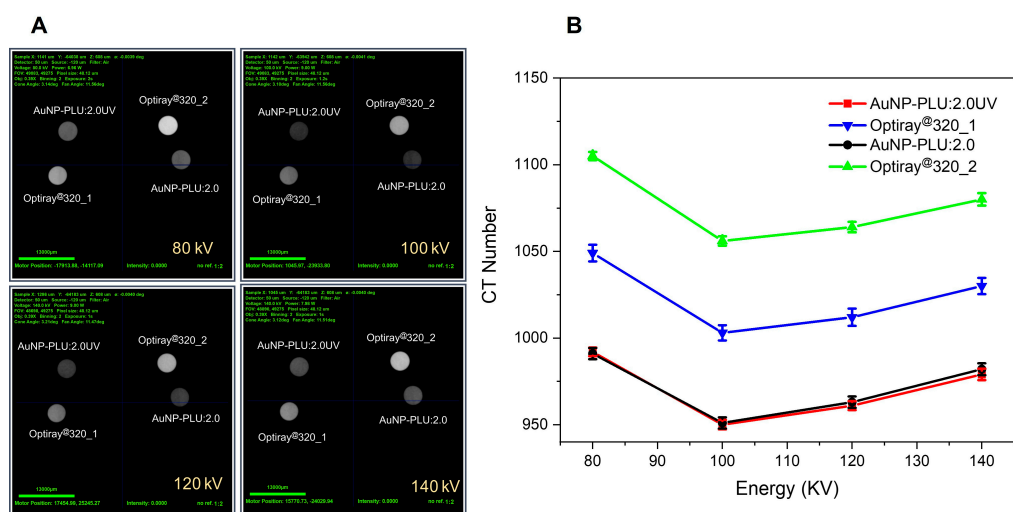


**Figure 8.** Fetal and placental development of rats treated with water (Control) or AuNP (Treated) during pregnancy. (A)—Fetal weight. (B)—Percentages of fetuses classified as small (SGA), adequate (AGA), or large (LGA) for gestational age. (C)—Ossification sites of fetuses. (D)—Placenta weight. (E)—Percentage of anomalies. (F)—Image of normal sternebra of rat fetuses. (G)—Incomplete ossification of sternebra (arrow). \*  $p < 0.05$  compared with the Control group (A,C,D—Student's *t*-test; B,F—Fisher's Exact test).

### 3.4. X-ray CT Scanner

X-ray computed tomography (CT) is an imaging technique used to uncover the interior features of a patient body in a three-dimensional view. The CT image stems from attenuation of the X-ray intensity by the body parts, in such a way that denser parts will attenuate more than softer ones. CT images can be produced from plain organs, but better resolution is only achieved using contrast agents, such as iodine and gadolinium. Indeed, greater atomic number elements will attenuate the incoming X-ray more [58].

Figure 9A shows CT images of AuNP-PLU: 2.0UV with Au of 1.23 mg/mL, compared with Optiray@320\_1 containing I at the same concentration ( $I = 1.23$  mg/mL), and AuNP-PLU: 2.0 containing Au concentration of 1.09 mg/mL, compared with Optiray@320\_2 with I at the same concentration ( $I = 1.09$  mg/mL) attained for beam energies of 80, 100, 120, and 140 KV. Figure 9B displays variations in the CT number with the beam energy for the commercial iodine contained contrast Optiray@320 and photochemically made Au-PLU:2.0UV. To compare, samples of both contrast agents were tested at the same concentration (expressed in  $\text{mmol L}^{-1}$  of iodine or gold). Data from AuNP-PLU:2.0UV containing a Au concentration of 1.23 mg/mL was compared with data from Optiray@320\_1 with an I concentration of 1.23 mg/mL. Similarly, AuNP-PLU: 2.0 with a Au concentration of 1.09 mg/mL was compared with an Optiray@320\_2 sample with an I concentration of 1.09 mg/mL.



**Figure 9.** (A) CT images of AuNP-PLU:2.0UV with Au of 1.23 mg/mL compared with Optiray@320\_1 containing I at the same concentration (I = 1.23 mg/mL), and AuNP-PLU:2.0 containing a Au concentration of 1.09 mg/mL compared with Optiray@320\_2 with I at the same concentration (I = 1.09 mg/mL) attained for beam energies of 80, 100, 120, and 140 kV. (B) CT number attained for the same samples displayed in (A) as a function of beam energy.

As shown in Figure 9B, the Au-PLU samples provide CT contrast comparable to iodine for a same beam energy. Likewise, the CT number achieved with both agents is similar and decreases more or less linearly with the beam energy, as shown in Figure 9B. Furthermore, it is observed that the nanocomposite AuNP-PLU:2.0UV shows a closer CT number to its iodine control (Optiray@320\_1) than the AuNP-PLU:2.0 when compared with Optiray@320\_2. It is noteworthy that despite its established use, iodine as a contrast agent can promote unwanted side effects, ranging from a simple skin allergy to more acute effects including vascular permeation and renal toxicity [59]. Indeed, many patients cannot use iodine at all when submitted to CT procedures. Gadolinium is an alternative, although it provides lower contrast at comparable doses [60]. Recently, AuNPs were tested for this task and showed even better attenuation ability than iodine allied to longer circulation time, which enables for more accurate observation of vessels and tissues [61]. Furthermore, they can be designed with biocompatible and non-toxic surface coatings, which mitigate eventual side effects during administration [62]. Considering that the proposed photochemical method uses light instead of a reducing agent and that PLU is recognized for its biocompatibility and negligible toxicity, the present Au-PLU:2.0UV is a potential contrast agent for CT.

#### 4. Conclusions

In this study we employed an UV-assisted synthesis protocol to produce biocompatible colloidal nanocomposites, comprising gold nanoparticles (AuNPs) and Pluronic F127 (PLU). Under optimized conditions, the proposed synthesis process produces AuNP-PLU nanocomposites at much faster rates (at least six times) than the process conducted under ambient light. Moreover, the synthesized nanoparticles display a controlled shape, narrower size distribution, and lower levels of PLU. Cytotoxicity assays demonstrate that the AuNP-PLU produced under UV irradiation is significantly less toxic than that produced under ambient light. In vivo maternal and fetal toxicity assays in rats reveal this nanocomposite is safe for both mother and fetus. As a proof of concept, we tested the nanocomposite as a contrast agent in X-ray computed tomography scans and found that it performs similarly to the commercially available iodine contrast agent Optiray@320. This is a promising feature, suggesting that AuNP-PLU synthesized under UV irradiation has high potential as a biocompatible nanocarrier and contrast agent.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/polym15092163/s1>, Figure S1: The UV-vis spectra precursors and control samples title; Figure S2: Changes in the maximum absorption of the plasmonic band during the reaction time title; Figure S3: The nanocomposites thermogravimetric analysis title; Figure S4: Nanoparticle diameter histogram title; Figure S5: Scattered light intensity distribution profiles as a function of the hydrodynamic diameter title; Figure S6: Effect of PLU on viability of the NIH-3T3 cells determined by MTT assay title.

**Author Contributions:** Conceptualization, M.A.G.S., L.G.P. and G.T.V.; methodology, D.S.B.G., R.Q.M.-S., D.M. and M.R.S.; software, A.V.G. and D.P.P.B.; validation, D.S.B.G., R.Q.M.-S. and B.M.H.; formal analysis, D.P.P.B. and A.B.S.S.; investigation, S.M.F., D.M., P.P.C.S., L.R.d.A. and A.V.G.; writing—original draft preparation, D.S.B.G. and R.Q.M.-S.; writing—review and editing, M.A.G.S., L.G.P., G.T.V., L.R.d.A., A.V.G., D.M. and P.P.C.S.; visualization, D.P.P.B.; supervision, M.A.G.S.; project administration, M.A.G.S.; funding acquisition, M.A.G.S., S.M.F., L.G.P. and G.T.V. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** The financial support from the Brazilian agencies MCT-CNPq (Process 424152/2016-9), FINEP, FAP-DF, FINATEC and CAPES is gratefully acknowledged. Support from the FP7-PEOPLE-HIGRAPHEN project (612704) is also acknowledged. M.A.G.S. thanks the Universidade de Brasilia (Edital DPI/DPG 02/2021) for financial support. D.S.B.G. thanks FAPERO (process n. 07/2014-015).

**Institutional Review Board Statement:** The Protocol N° 23108.022668/2019-23, related to the Project entitled “Effects of Treatment with Gold, Iron and Polymeric Nanoparticles on the Pregnancy of Rats”, is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA). This Project was approved by the Committee on Ethics in the Use of Animals of Araguaia (Federal University of Mato Grosso—UFMT/Campus of Araguaia) in reunion at 04/05/2019.

**Data Availability Statement:** Not applicable.

**Acknowledgments:** The authors thank MSc P. R. Teixeira for performing the cyclic voltammetry experiments.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Wei, X.Z.; Mulvaney, P. Chapter 3—Optical Properties of Strongly Coupled Plasmonic Nanoparticle Clusters. In *Modern Plasmonics*; Maradudin, A., Sambles, J.R., William, L.B., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2014; Volume 4, pp. 75–108.
2. Csaki, A.; Thiele, M.; Jacqueline Jatschka, J.; Dathe, A.; Zopf, D.; Stranik, O.; Fritzsche, W. Plasmonic nanoparticle synthesis and bioconjugation for bioanalytical sensing. *Eng. Life Sci.* **2015**, *15*, 266–275. [[CrossRef](#)]
3. Pallotta, A.; Boudier, A.; Creusot, B.; Brun, E.; Sicard-Roselli, C.; Bazzi, R.; Roux, S.; Clarot, I. Quality control of gold nanoparticles as pharmaceutical ingredients. *Int. J. Pharm.* **2019**, *569*, 118583. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Zhang, X.-D.; Wu, H.-Y.; Wu, D.; Wang, Y.-W.; Chang, J.H.; Zhai, Z.-B.; Meng, A.-M.; Liu, P.-X.; Zhang, L.-A.; Fan, F.-Y. Toxicologic effects of gold nanoparticles in vivo by different administration routes. *Int. J. Nanomed.* **2010**, *5*, 771–781. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Kaur, A.; Shimoni, O.; Wallach, M. Novel screening test for celiac disease using peptide functionalised gold nanoparticles. *World J. Gastroenterol.* **2018**, *24*, 5379–5390. [[CrossRef](#)]
6. Martínez Porcel, J.E.; Churio, M.S.; Moya, S.E.; Arce, V.B.; Martire, D.O. Plasmonic silica-gold core-shell nanoparticles: Interaction with organic dyes for light-induced applications. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **2022**, *431*, 114016. [[CrossRef](#)]
7. Liu, J.; Shen, Y.; Guangxian, W.; Xiang, Y.; Guo, Y.; Sun, X.; Liu, Y. Highly-sensitive electrochemiluminescence biosensor for detection of inosine monophosphate in meat based on graphdiyne/AuNPs/luminol nanocomposites. *Food Sci. Hum. Wellness* **2023**, *12*, 1149–1156. [[CrossRef](#)]
8. Vieira, F.M.; Gabriela Calisto, C.M.; Izumi, C. Construction of SERS substrates by gold nanoparticles assembly on polymeric matrices. *Appl. Surf. Sci.* **2023**, *612*, 155818. [[CrossRef](#)]
9. Tao, Z.; Feng, J.; Yang, F.; Zhang, L.; Shen, H.; Cheng, Q.; Liu, L. Plasmon-enhanced photocatalysis using gold nanoparticles encapsulated in nanoscale molybdenum oxide shell. *Nanotechnology* **2023**, *34*, 155604. [[CrossRef](#)]
10. Hainfeld, J.F.; Slatkin, D.N.; Focella, T.M.; Smilowitz, H.M. Gold nanoparticles: A new X-ray contrast agent. *Br. J. Radiol.* **2006**, *79*, 248–253. [[CrossRef](#)]
11. Silvestri, A.; Zambelli, V.; Ferretti, A.M.; Salerno, D.; Bellani, G.; Polito, L. Design of functionalized gold nanoparticle probes for computed tomography imaging. *Contrast Media Mol. Imaging* **2016**, *11*, 405–414. [[CrossRef](#)]

12. Tu, N.V.; Anh, N.N.; Hau, T.V.; Hao, N.V.; Huyen, N.T.; Thang, B.H.; Minh, P.N.; Chuc, N.V.; Fukata, N.; Trinh, P.V. Improving the efficiency of n-Si/PEDOT:PSS hybrid solar cells by incorporating AuNP-decorated graphene oxide as a nanoadditive for conductive polymers. *RSC Adv.* **2022**, *12*, 27625–27632. [[PubMed](#)]
13. Rizalputri, L.N.; Anshori, I.; Handayani, M.; Gumilar, G.; Septiani, N.L.W.; Hartati, Y.W.; Annas, M.S.; Purwidyantri, A.; Prabowo, B.A.; Brian Yulianto, B. Facile and controllable synthesis of monodisperse gold nanoparticle bipyramid for electrochemical dopamine sensor. *Nanotechnology* **2023**, *35*, 55502. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Sun, K.; Xia, N.; Zhao, L.; Liu, K.; Hou, W.; Liu, L. Aptasensors for the selective detection of alpha-synuclein oligomer by colorimetry, surface plasmon resonance and electrochemical impedance spectroscopy. *Sens. Actuators B Chem.* **2017**, *245*, 87–94. [[CrossRef](#)]
15. Doherty, B.; Csáki, A.; Thiele, M.; Zeisberger, M.; Schwuchow, A.; Kobelke, J.; Fritzsche, W.; Schmidt, M.A. Nanoparticle functionalised smallcore suspended-core fibre—A novel platform for efficient sensing. *Biomed. Opt. Express* **2017**, *8*, 790–799. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Xie, T.; Jing, C.; Long, Y.-T. Single plasmonic nanoparticles as ultrasensitive sensors. *Analyst* **2017**, *142*, 409–420. [[CrossRef](#)]
17. Zhenga, K.; Zhoua, D.; Wud, L.; Lia, J.; Zhaoa, B.; Zhange, S.; Heb, R.; Xiaof, L.; Zoyae, I.; Yub, L.; et al. Gold-nanoparticle-based multistage drug delivery system for antitumor therapy. *Drug Deliv.* **2022**, *29*, 3186–3196. [[CrossRef](#)]
18. Irvin-Choy, N.S.; Nelson, K.M.; Dang, M.N.; Gleghorn, J.P.; Day, E.S. Gold nanoparticle biodistribution in pregnant mice following intravenous administration varies with gestational age. *Nanomedicine* **2021**, *36*, 102412. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Yang, H.; Du, L.; Tian, X.; Fan, Z.; Sun, C.; Liu, Y.; Keelan, J.A.; Nie, G. Effects of nanoparticle size and gestational age on maternal biodistribution and toxicity of gold nanoparticles in pregnant mice. *Toxicol Lett.* **2014**, *230*, 10–18. [[CrossRef](#)]
20. Semmler-Behnke, M.; Lipka, J.; Wenk, A.; Hirn, S.; Schaffler, M.; Tian, F.; Schmid, G.; Oberdörster, G.; Kreyling, W.G. Size dependent translocation and fetal accumulation of gold nanoparticles from maternal blood in the rat. *Part Fibre Toxicol.* **2014**, *11*, 33. [[CrossRef](#)]
21. Alexandridis, P. Gold Nanoparticle Synthesis, Morphology Control, and Stabilization Facilitated by Functional Polymers. *Chem. Eng. Technol.* **2011**, *34*, 15–28. [[CrossRef](#)]
22. Alexandridis, P.; Tsianou, M. Block copolymer-directed metal nanoparticle morphogenesis and organization. *Eur. Polym. J.* **2011**, *47*, 569–583. [[CrossRef](#)]
23. Saha, K.; Agasti, S.S.; Kim, C.; Li, X.; Rotello, V.M. Gold Nanoparticles in Chemical and Biological Sensing. *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 2739–2779. [[CrossRef](#)]
24. Nguyen, H.V.; Nguyen, H.V.; Phan, V.M.; Park, B.J.; Seo, T.S. Serially diluting centrifugal microfluidics for high-throughput gold nanoparticle synthesis using an automated and portable workstation. *Chem. Eng. J.* **2023**, *452*, 139044. [[CrossRef](#)]
25. Cabrera, G.F.S.; Balbin, M.M.; Eugenio, P.J.G.; Zapanta, C.S.; Monserate, J.J.; Salazar, J.R.; Mingala, C.N. Green synthesis of gold nanoparticles reduced and stabilized by sodium glutamate and sodium dodecyl sulfate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2017**, *484*, 774–780. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Shajkumar, A.; Nandan, B.; Sanwaria, S.; Albrecht, V.; Libera, M.; Lee, M.-H.; Auffermann, G.; Stamm, M.; Horechyy, A. Silica-supported Au@hollow-SiO<sub>2</sub> particles with outstanding catalytic activity prepared via block copolymer template approach. *J. Colloid Interface Sci.* **2017**, *491*, 246–254. [[CrossRef](#)]
27. Maguire, P.; Rutherford, D.; Macias-Montero, M.; Mahony, C.; Kelsey, C.; Tweedie, M.; Pérez-Martin, F.; McQuaid, H.; Diver, D.; Mariotti, D. Continuous In-Flight Synthesis for On-Demand Delivery of Ligand-Free Colloidal Gold Nanoparticles. *Nano Lett.* **2017**, *17*, 1336–1343. [[CrossRef](#)]
28. Patil, M.P.; Kim, G.-D. Eco-friendly approach for nanoparticles synthesis and mechanism behind antibacterial activity of silver and anticancer activity of gold nanoparticles. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2017**, *101*, 79–92. [[CrossRef](#)]
29. Sakai, T.; Alexandridis, P. Single-Step Synthesis and Stabilization of Metal Nanoparticles in Aqueous Pluronic Block Copolymer Solutions at Ambient Temperature. *Langmuir* **2004**, *20*, 8426–8430. [[CrossRef](#)]
30. Grzelczak, M.; Liz-Marzan, L.M. The relevance of light in the formation of colloidal metal nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 2089–2097. [[CrossRef](#)]
31. Gomes, D.S.; Paterno, L.G.; Santos, A.B.; Garay, A.V.; Mertz, D.; Freitas, S.M.; Soler, M.A. New insights on the formation of gold nanoparticles and Pluronic nanocomposites: Kinetics and thermodynamics parameters. *J. Mol. Liq.* **2018**, *268*, 181–189. [[CrossRef](#)]
32. Santos, D.C.; de Souza, V.C.; Vasconcelos, D.A.; Andrade, G.R.S.; Gimenez, I.F.; Teixeira, Z. Triblock copolymer-mediated synthesis of catalytically active gold nanostructures. *J. Nanopart. Res.* **2018**, *20*, 105. [[CrossRef](#)]
33. Sokolsky-Papkov, M.; Kabanov, A. Synthesis of Well-Defined Gold Nanoparticles Using Pluronic: The Role of Radicals and Surfactants in Nanoparticles Formation. *Polymers* **2019**, *11*, 1553. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Pal, A. Photoinitiated gold sol generation in aqueous Triton X-100 and its analytical application for spectrophotometric determination of gold. *Talanta* **1998**, *46*, 583–587. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Mandal, M.; Ghosh, S.K.; Kundu, S.; Esumi, K.; Pal, T. UV Photoactivation for Size and Shape Controlled Synthesis and Coalescence of Gold Nanoparticles in Micelles. *Langmuir* **2002**, *18*, 7792–7797. [[CrossRef](#)]
36. Shang, Y.; Min, C.; Hu, J.; Wang, T.; Liu, H.; Hu, Y. Synthesis of gold nanoparticles by reduction of HAuCl<sub>4</sub> under UV irradiation. *Solid State Sci.* **2013**, *15*, 17–23. [[CrossRef](#)]
37. Teixeira, P.R.; Santos, M.S.; Silva, A.L.G.; Bão, S.N.; Azevedo, R.B.; Sales, M.J.A.; Paterno, L.G. Photochemically-assisted synthesis of non-toxic and biocompatible gold nanoparticles. *Colloid Surf. B-Biointerfaces* **2016**, *148*, 317–323. [[CrossRef](#)]

38. Mallick, K.; Wang, Z.; Pal, T. Seed-mediated successive growth of gold particles accomplished by UV irradiation: A photochemical approach for size-controlled synthesis. *J. Photochem. Photobiol. A-Chem.* **2001**, *140*, 75–80. [[CrossRef](#)]
39. Alexandridis, P.; Holzwarth, J.F.; Hatton, T.A. Micellization of Poly(ethylene oxide)-Poly(propylene oxide)-Poly(ethylene oxide) Triblock Copolymers in Aqueous Solutions: Thermodynamics of Copolymer Association. *Macromolecules* **1994**, *27*, 2414–2425. [[CrossRef](#)]
40. Soares, T.S.; Moraes-Souza, R.Q.; Carneiro, T.B.; Araujo-Silva, V.C.; Schavinski, A.Z.; Gratão, T.B.; Damasceno, D.C.; Volpato, G.T. Maternal-fetal outcomes of exercise applied in rats with mild hyperglycemia after embryonic implantation. *Birth Defects Res.* **2021**, *113*, 287–298. [[CrossRef](#)]
41. Reagan-Shaw, S.; Nihal, M.; Ahmad, N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J.* **2008**, *22*, 659–661. [[CrossRef](#)]
42. Gallego, F.Q.; Sinzato, Y.K.; Miranda, C.A.; Iessi, I.L.; Dallaqua, B.; Volpato, G.T.; Scarano, W.R.; SanMartín, S.; Damasceno, D.C. Pancreatic islet response to diabetes during pregnancy in rats. *Life Sci.* **2018**, *214*, 1–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Paula, V.G.; Cruz, L.L.; Sene, L.B.; Gratão, T.B.; Soares, T.S.; Moraes-Souza, R.Q.; Damasceno, D.C.; Volpato, G.T. Maternal-fetal repercussions of *Phyllanthus niruri* L. treatment during rat pregnancy. *J. Ethnopharmacol.* **2020**, *254*, 112728. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Wilson, J.G. Methods for administering agents and detecting malformations in experimental animal. In *Teratology: Principles and Techniques*; Wilson, J.C., Warkany, J., Eds.; University of Chicago Press: Chicago, IL, USA, 1965; pp. 47–74.
45. Staples, R.E.; Schnell, V.L. Refinements in rapid clearing technique in the KOH-alizarin red S method for fetal bone. *Stain Technol.* **1964**, *39*, 61–63.
46. Aliverti, V.; Bonanomi, L.; Giavini, E.; Leone, V.G.; Mariani, L. The extent of fetal ossification as an index of delayed development in teratogenic studies on the rat. *Teratology* **1979**, *20*, 237–242. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Moraes-Souza, R.Q.; Reinaque, A.P.; Soares, T.S.; Silva, A.L.T.; Giunchetti, R.C.; Takano, M.A.S.; Akamatsu, M.A.; Kubrusly, F.S.; Lúcio-Macarini, F.; Raw, I.; et al. Safety evaluation of a vaccine: Effect in maternal reproductive outcome and fetal anomaly frequency in rats using a leishmanial vaccine as a model. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0172525. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Correia, J.J.; Stafford, W.F. Sedimentation Velocity: A Classical Perspective. In *Methods in Enzymology*; Cole, J.L., Ed.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2015; Volume 562, pp. 49–80.
49. Shiraiishi, Y.; Tanaka, H.; Sakamoto, H.; Ichikawa, S.; Takayuki, H. Photoreductive synthesis of monodispersed Au nanoparticles with citric acid as reductant and surface stabilizing reagent. *RSC Adv.* **2017**, *7*, 6187–6192. [[CrossRef](#)]
50. Dugershaw, B.B.; Aengenheister, L.; Hansen, S.S.K.; Hougaard, K.H.; Buerki-Thurnherr, T. Recent insights on indirect mechanisms in developmental toxicity of nanomaterials. *Part. Fibre Toxicol.* **2020**, *17*, 31. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Aengenheister, L.; Dietrich, D.; Sadeghpour, A.; Manser, P.; Diener, L.; Wichser, A.; Karst, U.; Peter Wick, P.; Buerki-Thurnherr, T. Gold nanoparticle distribution in advanced in vitro and ex vivo human placental barrier models. *J Nanobiotechnol.* **2018**, *16*, 79. [[CrossRef](#)]
52. Yamashita, K.; Yoshioka, Y.; Higashisaka, K.; Mimura, K.; Morishita, Y.; Nozaki, M. Silica and titanium dioxide nanoparticles cause pregnancy complications in mice. *Nat. Nanotechnol.* **2011**, *6*, 321–328. [[CrossRef](#)]
53. Hong, F.; Zhou, Y.; Zhao, X.; Sheng, L.; Wang, L. Maternal exposure to nanosized titanium dioxide suppresses embryonic development in mice. *Int. J. Nanomed.* **2017**, *12*, 6197–6204. [[CrossRef](#)]
54. Mohamadzadeh, N.; Zirak Javanmard, M.; Karimipour, M.; Farjah, G. Developmental toxicity of the neural tube induced by titanium dioxide nanoparticles in mouse embryos. *Avicenna J. Med. Biotechnol.* **2021**, *13*, 74–80. [[CrossRef](#)]
55. Leal-Silva, T.; Souza, M.R.; Cruz, L.L.; Moraes-Souza, R.Q.; Paula, V.G.; Soares, T.S.; Dela Justina, V.; Giachini, F.R.; Daasceno, D.C.; Américo, M.F.; et al. Toxicological effects of the Morinda citrifolia L. fruit extract on maternal reproduction and fetal development in rats. *Drug Chem. Toxicol.* **2023**, *46*, 609–615. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Cha, J.; Sun, X.; Dey, S.K. Mechanisms of implantation: Strategies for successful pregnancy. *Nat. Med.* **2012**, *18*, 1754–1767. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Moraes-Souza, R.Q.; Soares, T.S.; Carmo, N.O.; Damasceno, D.C.; Campos, K.E.; Volpato, G.T. Adverse effects of Croton urucurana B. exposure during rat pregnancy. *J. Ethnopharmacol.* **2017**, *199*, 328–333. [[CrossRef](#)]
58. Withers, P.J.; Bouman, C.; Carmignato, S.; Cnudde, V.; Grimaldi, D.; Hagen, C.K.; Maire, E.; Manley, M.; Du Plessis, A.; Stock, S.R. X-ray computed tomography. *Nat. Rev. Methods Prim.* **2021**, *1*, 18. [[CrossRef](#)]
59. Andreucci, M.; Solomon, R.; Tasanarong, A. Side effects of radiographic contrast media: Pathogenesis, risk factors, and prevention. *BioMed Res Int.* **2014**, *2014*, 741018. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Bongers, M.N.; Schabel, C.; Krauss, B.; Claussen, C.D.; Nikolaou, K.; Thomas, C. Potential of gadolinium as contrast material in second generation dual energy computed tomography—An ex vivo phantom study. *Clin. Imaging* **2017**, *43*, 74–79. [[CrossRef](#)]
61. Mesbahi, A.; Famouri, F.; Ahar, M.; Ghaffari, M.; Ghavami, S. A study on the imaging characteristics of Gold nanoparticles as a contrast agent in X-ray computed tomography. *Pol. J. Med. Phys. Eng.* **2017**, *23*, 9–14. [[CrossRef](#)]
62. Santos-Martinez, M.J.; Rahme, K.; Corbalan, J.J.; Faulkner, C.; Holmes, J.D.; Tajber, L.; Medina, C.; Radomski, M.W. Pegylation Increases Platelet Biocompatibility of Gold Nanoparticles. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2014**, *10*, 1004–1015. [[CrossRef](#)]

**Disclaimer/Publisher’s Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.